



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Purificação e caracterização da proteína plasmática
que se liga a β -1,3-glicanas (β GBP) dos camarões
nativos *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus
schmitti***

Priscila Gonçalves

FLORIANÓPOLIS

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Purificação e caracterização da proteína plasmática
que se liga a β -1,3-glicanas (β GBP) dos camarões
nativos *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus
schmitti***

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas

Acadêmica: Priscila Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Perazzolo

Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura / UFSC

FLORIANÓPOLIS
2009

Dedico ao meu saudoso avô,
por toda sua luz e amor em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas fundamentais na realização desse trabalho, bem como as de importância imensurável em minha formação acadêmica.

Aos meus protetores Divinos, por terem me guiado, iluminado e colocado em meu caminho pessoas especiais. E pela oportunidade de conhecer e aprender com cada uma delas.

À professora Luciane Maria Perazzolo, com enorme carinho, pela confiança em mim depositada e pelos desafios que me propôs, pela disponibilidade, pela acolhida e pelos ensinamentos. Agradeço, ainda, pela paciência e sabedoria na condução desse trabalho, do qual resultaram essa produção e o crescimento profissional e pessoal.

À professora Margherita Barracco, por sua solicitude, pelos valiosos conselhos e ensinamentos, pela inestimável força no decorrer de minha formação, pelo apoio constante e pelo exemplo de ética, profissionalismo e de profunda dedicação à pesquisa.

Aos órgãos de fomento CNPq e FINEP, pelo apoio financeiro.

Ao professor Hernán Terenzi e seu grupo de pesquisa, em especial ao Javier Vernal, pela valiosa colaboração no desenvolvimento desse trabalho e pelo auxílio, inclusive, na análise dos resultados.

Ao Maurício, pelo fornecimento dos camarões nativos durante as etapas iniciais desse trabalho, e à Cris, por compartilhar a hemolinfa desses animais durante meses. Ao professor Rogério Gargioni pela prestatibilidade, principalmente em relação aos aquários.

Aos mais que colegas de laboratório Liegilda, Paulinha, Marion, Cris e Pedro, pelo entusiasmo contagiante, pelos agitos, pelas conversas sinceras e pela convivência sempre divertidíssima. Aos colegas Gabi e Erik, pelo agradável convívio e aos eternos Rafa e Dél, pelos primeiros e imprescindíveis ensinamentos no laboratório e pela disposição e alegria de sempre.

Às amadas Elis e Nana, Lu, Dai, May, Mari e Su, pelo companheirismo, pela força, pelas festas, pelas fofocas, pelas risadas, e, sobretudo, pela amizade verdadeira. Aos mox quiridox Alê, Japa, Kenny e André, pela eterna e contagiante alegria, e por me mostrar que com vocês não há tempo ruim. Ao Diego, por dividir comigo as vitórias e frustrações desse trabalho. E, a todos os demais amigos da turma mais legal e de curso.

Às amigas de sempre, Miri e Amanda, companheiras de risadas e confidências. Obrigada pelos conselhos, apoio, incentivo e por sempre terem estado presentes nas minhas horas de crises e dúvidas cruéis.

A todos da minha família, avôs, tios, tias, primos, pela constante motivação, apoio e amor demonstrados, incentivando-me e torcendo por minhas conquistas.

E, agradeço principalmente às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Max e Grenia, e meu irmão, Lucas. O meu mais sincero obrigada a vocês que não raras vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Porque sem o suporte de vocês, nada disso teria acontecido e nada valeria à pena. Meu carinho e minha eterna gratidão, amo vocês!

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

Mário Quintana

RESUMO

A β GBP é uma lipoglicoproteína plasmática envolvida tanto no transporte de lipídeos quanto no sistema imune de crustáceos, reconhecendo especificamente β -1,3-glicanas da parede celular de fungos. A ligação do complexo β GBP-glicanas na superfície das células imunocompetentes (hemócitos) promove a adesão celular e a exocitose de moléculas imunológicas, como as do sistema pró-fenoloxidase (proPO), que é um importante mecanismo de defesa em crustáceos. O objetivo desse estudo foi purificar e caracterizar a β GBP dos camarões nativos *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*, bem como avaliar a sua participação sobre a ativação do sistema proPO e a sua capacidade aglutinante. A β GBP foi purificada a partir do plasma através de precipitação por baixa força iônica seguida por cromatografia de troca aniônica. A fração purificada de β GBP foi eluída com NaCl 0,22 M e identificada por *western blotting* como uma proteína monomérica de aproximadamente 100 kDa, reconhecida pelo anti- β GBP policlonal de *L. vannamei*. A identidade da β GBP foi ainda confirmada por espectrometria de massa, mostrando que os resíduos idênticos da β GBP dos camarões nativos cobriram 10% e 16%, respectivamente, da sequência da β GBP de *L. vannamei*, demonstrando assim uma homologia relativa entre a β GBP desses três peneídeos. A β GBP complexada à laminarina induziu um aumento de 3 vezes na atividade específica da PO ($395,56 \pm 8,89$ e $422,22 \pm 11,56$ U/min/mg em *F. paulensis* e *L. schmitti*, respectivamente) em relação à laminarina ($148,44 \pm 26,67$ e $113,33 \pm 30,89$ U/min/mg) ou β GBP isoladas ($129,78 \pm 4,44$ e $171,11 \pm 3,11$ U/min/mg). No entanto, nenhuma atividade serino-proteásica foi encontrada associada a essa ativação, não possibilitando a compreensão do mecanismo pelo qual o complexo β GBP-laminarina aumentou a ativação do sistema proPO nesses animais. A β GBP mostrou-se ainda capaz de aglutinar *in vitro* células de levedura, demonstrando a sua especificidade por β -1,3-glicanas e sugerindo tratar-se de uma molécula bivalente com, no mínimo, dois sítios de reconhecimento-padrão. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a relevante participação da molécula no sistema imune desses camarões e representam uma contribuição para um maior conhecimento do sistema imune dos camarões marinhos nativos.

Palavras-chave: sistema imune; crustáceos; *Farfantepenaeus paulensis*; *Litopenaeus schmitti*; proteínas de reconhecimento- padrão (PRPs); proteína que se liga a β -1,3-glicanas (β GBP); sistema pró-fenoloxidase (proPO); aglutinação de leveduras.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Indivíduo adulto da espécie *Farfantepenaeus paulensis*. 9
- Figura 2.** Indivíduos sub-adultos da espécie *Litopenaeus schmitti*. 9
- Figura 3.** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 7,5% (β -ME 5%) do plasma total (A) e da fração enriquecida de β GBP obtida por precipitação por baixa força iônica a partir do plasma (B) de *Farfantepenaeus paulensis* (Fp) e *Litopenaeus schmitti* (Ls). As amostras de plasma contêm aproximadamente 50 μ g de proteína total, enquanto as frações enriquecidas contêm aproximadamente 100 μ g no caso de *F. paulensis* e 120 μ g de *L. schmitti*. (M) Marcadores de peso molecular. Os asteriscos (*) indicam a β GBP (~100 kDa). 17
- Figura 4.** Purificação da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* (A) e *Litopenaeus schmitti* (B) por cromatografia de troca aniônica. Alíquotas da fração enriquecida de β GBP (5 mg) foram aplicadas em coluna Resource Q e as proteínas eluídas com gradiente linear de NaCl 0,10-0,35 M. As frações purificadas de β GBP foram eluídas com NaCl 0,22 M (seta). A barra (—) indica frações contendo hemocianina. 1
- Figura 5.** (A) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 7,5% (β -ME 5%) da β GBP purificada (50 μ g) de *Farfantepenaeus paulensis* (Fp) e *Litopenaeus schmitti* (Ls), por cromatografia de troca aniônica. (M) Marcadores de peso molecular. (B) Curva de regressão linear utilizada para estimar o peso molecular da β GBP purificada. 20
- Figura 6.** Imunodeteção da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* (Fp) e *Litopenaeus schmitti* (Ls) a partir de amostras de plasma (A) e frações de β GBP purificadas (B) por cromatografia de troca aniônica, utilizando anti- β GBP (1:10.000) de *Litopenaeus vannamei*. Cada poço contém aproximadamente 5 μ g de proteína total. O marcador de peso molecular é apresentado à direita. 20
- Figura 7.** Estrutura primária da β GBP de *Litopenaeus vannamei*. Resíduos idênticos da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis*, obtidos a partir da digestão com tripsina e análise em MALDI-TOF, são destacados em vermelho. A sequência N-terminal encontra-se sublinhada, as sequências de clivagem R(K)/X/X/R(K) em negrito, os domínios semelhantes às glucanases em itálico e o motivo de adesão celular RGD sublinhado por linha pontilhada. 22

Figura 8. Estrutura primária da β GBP de *Litopenaeus vannamei*. Resíduos idênticos da β GBP de *Litopenaeus schmitti*, obtidos a partir da digestão com tripsina e análise em MALDI-TOF, são destacados em vermelho. A sequência N-terminal encontra-se sublinhada, as sequências de clivagem R(K)/X/X/R(K) em negrito, os domínios semelhantes às glucanases em itálico e o motivo de adesão celular RGD sublinhado por linha pontilhada.

23

Figura 9. Atividade específica da PO aos 5 min de reação, após incubação do HLS com β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti* complexada com laminarina. Nos controles, utilizou-se somente laminarina (1 mg/ml) ou β GBP (~50 μ g/ml). O ensaio foi realizado em triplicata. Dados representam média \pm DP.

26

Figura 10. Aglutinação de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (10^7 células/ml) após incubação com β GBP (~50 μ g/ml) de *Farfantepenaeus paulensis* (A) e *Litopenaeus schmitti* (D). Nos experimentos controle utilizou-se o complexo β GBP-laminarina (B) e (E) ou BSA (C) e (F).

30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da atividade serino-proteásica da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*, utilizando o peptídeo cromogênico BAPNA ($\lambda = 405$ nm).

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>)
βGBP	Proteína que se liga a β-1,3-glicanas (do inglês, <i>β-1,3-glucan binding protein</i>)
CaCl₂	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
DMSO	Dimetil sulfóxido
dsRNA	RNA dupla fita (do inglês, <i>double-stranded RNA</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>high density lipoprotein</i>)
HLS	Sobrenadante de lisado de hemócitos (do inglês, <i>hemocyte lysate supernatant</i>)
IMNV	Vírus da mionecrose infecciosa muscular (do inglês, <i>infectious myonecrosis virus</i>)
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Dihidrogenofosfato de potássico
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF	Do inglês, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight</i>
MAS	Solução de Alsever Modificada (do inglês, <i>Modified Alsever Solution</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Tampão salina fosfato (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>)
PM	Peso molecular
PO	Fenoloxidase
PPAEs	Enzimas ativadoras da proPO (do inglês, <i>proPO-activating enzymes</i>)
proPO	Pró-fenoloxidase

PRP	Proteína de reconhecimento-padrão (do inglês, <i>pattern-recognition proteins</i>)
Rf	Fator de retenção (do inglês, <i>retention factor</i>)
RNAi	RNA de interferência
RNI	Espécie intermediária reativa de nitrogênio (do inglês, <i>reactive nitrogen intermediate</i>)
ROI	Espécie intermediária reativa de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen intermediate</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (do inglês, <i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SOD	Superóxido dismutase
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
WSSV	Vírus da síndrome da mancha branca (do inglês, <i>white spot syndrome virus</i>)

Aminoácidos

A – Alanina	C – Cisteína	D – Ácido Aspártico
E – Ácido Glutâmico	F – Fenilalanina	G – Glicina
H – Histidina	I – Isoleucina	K – Lisina
L – Leucina	M – Metionina	N – Asparagina
P – Prolina	Q – Glutamina	R – Arginina
S – Serina	T – Treonina	V – Valina
W – Triptofano	Y – Tirosina	

SÚMARIO

RESUMO	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 Material biológico	9
3.2 Coleta de hemolinfa	10
3.3 Preparo do sobrenadante de lisado de hemócitos (HLS)	10
3.4 Precipitação da β GBP por baixa força iônica – etapa de pré-purificação	10
3.5 Purificação da β GBP por cromatografia de troca aniônica	10
3.6 Determinação da concentração protéica das amostras	11
3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	11
3.8 Determinação do peso molecular da β GBP	12
3.9 Detecção e caracterização da β GBP por <i>Western blotting</i>	12
3.10 Identificação de sequências aminoacídicas internas por espectrometria de massa	13
3.11 Ação da β GBP sobre a ativação do sistema proPO	13
3.12 Ensaio de atividade serino-proteásica da β GBP	14
3.13 Aglutinação de células de levedura mediada pela β GBP	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Purificação e identificação da β GBP de <i>Farfantepenaeus paulensis</i> e <i>Litopenaeus schmitti</i>	16

4.2 Participação da β GBP no sistema imune de <i>Farfantepenaeus paulensis</i> e <i>Litopenaeus schmitti</i>	25
4.2.1 Ativação do sistema proPO	25
4.2.2 Propriedade aglutinante da β GBP	29
5. CONCLUSÕES	33
6. PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

Os crustáceos constituem um grupo zoológico antigo e bem sucedido, composto por mais de 42.000 espécies, sendo a maioria aquática. Dentre eles, destacam-se os representantes da Ordem Decapoda, como as lagostas, lagostins, caranguejos, siris e camarões, cujo interesse particular está na alimentação humana (BARRACCO et al., 2008).

A pesca indiscriminada vem ameaçando a manutenção dos estoques naturais de crustáceos a nível mundial. Dessa forma, o cultivo desses animais em cativeiro representa uma alternativa para preservar essas populações, assim como para fomentar o seu consumo para a alimentação humana. O cultivo de camarões marinhos tem merecido especial destaque não somente por sua importância econômica, mas também por sua contribuição à conservação dos estoques naturais de camarões, atualmente comprometidos pela pesca indiscriminada e destruição dos ecossistemas aquáticos.

Nas regiões brasileiras de clima subtropical, como o Sul e Sudeste, duas espécies nativas apresentam potencial para cultivo: o camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* e o branco *Litopenaeus schmitti*. Essas espécies destacam-se por apresentarem melhor adaptação às condições de cativeiro no Sul e Sudeste brasileiro, onde a temperatura pode cair abaixo do nível ótimo suportado pela maioria das espécies de camarões (HENNIG; ANDREATTA, 1998).

O camarão rosa *F. paulensis* (PÉREZ-FARFANTE; KENSLE, 1997) foi cultivado nas regiões Sul e Sudeste do país por cerca de 20 anos, porém, apesar dos promissores resultados obtidos na reprodução desses animais em cativeiro, a atividade em escala comercial não se mostrou competitiva e foi abandonada no final da década de 90 (R. E. ANDREATTA, comunicação pessoal). Em relação ao camarão branco *L. schmitti* (PÉREZ-FARFANTE; KENSLE, 1997), as tentativas de cultivo no Brasil ocorreram nas décadas de 80 e 90, no entanto, a sua produção em escala comercial também não se mostrou competitiva e a prática foi abandonada. Em Cuba, no entanto, essa espécie foi amplamente cultivada em escala comercial, em função do desenvolvimento da tecnologia de cultivo voltada para a espécie (JAIME; GALINDO, 2006).

A produção de camarões marinhos em escala comercial requer a intensificação dos sistemas de cultivo, necessitando maiores investimentos e cuidados no manejo.

As restrições mais frequentemente observadas em relação a essa prática são de ordem ambiental (degradação do ambiente e água imprópria), nutricional e sanitária (KAUTSKY et al., 2000). Atualmente, as doenças infecciosas, em especial as viroses, são consideradas o principal problema potencialmente devastador dos cultivos e responsável pelo refreamento na evolução da atividade a nível mundial (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008).

Os animais em cativeiro, não raro, são acometidos por enfermidades que dizimam populações inteiras, causando prejuízos econômicos e sociais, como o desemprego no setor. A exemplo disso tem-se o recente episódio ocorrido no Estado de Santa Catarina, onde o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV; do inglês, *white spot syndrome virus*) dizimou no ano de 2005 cerca de 75% do cultivo do camarão exótico *Litopenaeus vannamei* (WINCLER DA COSTA, 2006). No Nordeste brasileiro, onde se concentra 95% da produção nacional, o vírus da necrose muscular (IMNV; do inglês, *infectious myonecrosis virus*) também causou sérios prejuízos e incertezas sobre o futuro da atividade (NUNES et al., 2004).

Os crustáceos, assim como os demais invertebrados, apresentam apenas um sistema imune inato ou natural. Esses animais são, portanto, desprovidos de um sistema adaptativo e altamente específico, que inclui a imensa variedade de anticorpos específicos e células de memória, como ocorre nos vertebrados. A falta de um sistema imune adaptativo resulta, conseqüentemente, na impossibilidade de se desenvolverem vacinas, diminuindo de forma substancial os meios de prevenção e controle de doenças nesses animais (BARRACCO et al., 2008). Essa limitação crucial faz com que as infecções por microrganismos patogênicos sejam particularmente ameaçadoras.

Apesar de contarem apenas com o sistema imune inato, os mecanismos imunológicos desencadeados pelos crustáceos são extremamente rápidos e eficientes, o que lhes permite resistir e eliminar, na maioria dos casos, uma variedade de microrganismos e parasitas de seu organismo (*vide* revisões de SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998; BARRACCO et al., 2008). O sistema imune desses animais está intimamente ligado ao seu sangue ou hemolinfa, o qual consiste de uma fração celular (hemócitos) e de uma fração líquida (plasma), onde estão dissolvidos os fatores humorais. As respostas imunes celulares e humorais atuam em sinergismo, protegendo os crustáceos de invasões e infecções microbianas e parasitárias.

Os principais sistemas de defesa atualmente reconhecidos nos crustáceos são: (1) coagulação da hemolinfa; (2) melanização mediada pelo sistema pró-fenoloxidase; (3) reconhecimento e aglutinação celular mediada por lectinas; (4) sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais mediados por peptídeos, RNA de interferência (RNAi) e por proteínas de reconhecimento-padrão (PRPs); (5) produção de espécies reativas de oxigênio (ROIs) e de nitrogênio (RNIs); e (6) sistema fagocítico e de encapsulamento (*vide* revisões de IWANAGA; LEE, 2005; BARRACCO et al., 2008).

Os crustáceos possuem na hemolinfa moléculas capazes de discriminar eficientemente o “próprio” do “não-próprio” e, assim, desencadear mecanismos que resultem na neutralização e/ou destruição dos microrganismos e parasitas invasores. Essas reações são geralmente iniciadas pelo reconhecimento do agente invasor por proteínas de reconhecimento-padrão, presentes no hospedeiro. As proteínas de reconhecimento-padrão (PRPs; do inglês, *pattern-recognition proteins*) são moléculas produzidas pelo hospedeiro, secretadas para o plasma ou localizadas na superfície das células imunocompetentes (*vide* revisões de LEE; SÖDERHÄLL, 2002; BARRACCO et al., 2008). Essas moléculas reconhecem e interagem com padrões moleculares expressos exclusivamente na superfície de microrganismos e parasitas, denominados PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*). Em invertebrados, os principais PAMPs reconhecidos por PRPs são: lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanas de bactérias Gram-positivas, β -1,3-glicanas de fungos e o dsRNA (do inglês, *double-stranded RNA*) produzido durante a replicação de vários vírus (LEE; SÖDERHÄLL, 2002; BARRACCO et al., 2008).

Uma vez dentro do hospedeiro, os padrões moleculares dos patógenos são reconhecidos e se ligam a suas respectivas PRPs. Em crustáceos, tal interação promove a ativação dos hemócitos, desencadeando respostas imune-celulares, a exocitose e/ou a produção de moléculas imunoefetoras e/ou imunoreguladoras e, ainda, modulando a expressão de genes imunológicos específicos (BARRACCO et al., 2008).

Algumas PRPs são reconhecidas como sendo parte do sistema de ativação da pró-fenoloxidase ou sistema proPO. Além dessas moléculas, esse sistema é composto por vários zimógenos de proteases e pela proPO. O sistema proPO é tido como um importante mecanismo de reconhecimento do não-próprio nos artrópodes,

uma vez que é ativado por componentes da superfície de microrganismos e representa, assim, uma das principais respostas imunoefetoras dos crustáceos (*vide* revisão CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004; BARRACCO et al., 2008).

A ativação da enzima inativa (proPO) para sua forma ativa (PO) ocorre pela ação de serino-proteases, denominadas enzimas ativadoras da proPO (do inglês, *proPO-activating enzymes* ou PPAEs), as quais iniciam uma cascata proteolítica cujo produto final é a melanina. Em crustáceos, uma PPAE batizada de ppA foi purificada (ASPÁN; SÖDERHÄLL, 1991) e posteriormente clonada (WANG et al., 2001) dos hemócitos do lagostim *Pacifastacus leniusculus*. A ppA é sintetizada e mantida como um zimógeno (pró-ppA) nos grânulos dos hemócitos, sendo ativada após a exocitose concomitante à proPO, em decorrência de uma injúria ou infecção microbiana. Tal ativação ocorre através de clivagem proteolítica realizada por uma protease ainda não identificada (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004).

Em relação ao papel imunológico do sistema proPO, sabe-se que essa via gera transitoriamente moléculas altamente tóxicas, como as quinonas, hemiquinonas e radicais livres, as quais apresentam atividade citotóxica contra os patógenos invasores (NAPPI; OTTAVIANI, 2000). A melanina, *per se*, não é a molécula mais importante durante o processo, sendo sim os compostos citotóxicos intermediários e os radicais livres produzidos, os verdadeiros imunoefetores (NAPPI; VASS, 1993). No entanto, a melanina parece ter uma atividade fungistática (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004), podendo ainda funcionar como *scavenger* de radicais livres (NAPPI; VASS, 1993; NAPPI; OTTAVIANI, 2000), para minimizar os efeitos deletérios dessas moléculas altamente tóxicas para o organismo do hospedeiro. Sendo assim, a melanização representa, mais especificamente, o final de um potente processo imunoefetor desencadeado nos crustáceos (BARRACCO et al., 2008).

Dentre as PRPs presentes em crustáceos, destaca-se a proteína que se liga a β -1,3-glicanas, conhecida como β GBP (do inglês, *β -1,3-glucan binding protein*). Essa proteína é sintetizada no hepatopâncreas desses animais (CERENIUS et al., 1994; ROMO-FIGUEROA et al., 2004), sendo secretada e estando constitutivamente presente na hemolinfa. A β GBP é reconhecida como uma lipoproteína de alta densidade (HDL; do inglês, *high density lipoprotein*) envolvida simultaneamente no transporte de lipídeos e no reconhecimento do não-próprio, através da interação

com β -1,3-glicanas, que são carboidratos da parede celular de fungos (YÉPIZ-PLACENCIA et al., 1998).

A β GBP já foi identificada no plasma de vários crustáceos, entre eles, nos lagostins *P. leniusculus* (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990; CERENIUS et al., 1994), *Astacus astacus* e *Procambarus clarkii* (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1993), no caranguejo *Carcinus maenas* (THÖRNQVIST et al., 1994) e nos camarões *Farfantepenaeus californiensis* (VARGAS-ALBORES et al., 1996), *Litopenaeus stylirostris* (VARGAS-ALBORES et al., 1997) e *L. vannamei* (VARGAS-ALBORES et al., 1997; YÉPIZ-PLACENCIA et al., 1998; JIMENEZ-VEGA et al., 2002; ROMO-FIGUEROA et al., 2004). Essas moléculas foram caracterizadas como lipoglicoproteínas monoméricas de 95 a 112 kDa. Em camarões, apresentam-se glicosiladas com resíduos de açúcar contendo manose ou glicose e N-acetilglicosamina (VARGAS-ALBORES et al., 1996; 1997), e possuem uma alta porcentagem de lipídeos (aproximadamente 50%), sendo os fosfolipídeos a classe predominante (RUIZ-VERDUGO et al., 1997).

Essas proteínas apresentam ainda domínios semelhantes às glucanases bacterianas, porém sem atividade catalítica. Acredita-se que essas proteínas tenham evoluído a partir de proteínas semelhantes às glucanases bacterianas e que, durante a evolução, tenham perdido a atividade enzimática. No entanto, a propriedade de se ligar ao padrão molecular foi conservada, garantindo assim a sua participação no sistema imune desses animais (LEE et al., 2000). Além disso, contêm um motivo de adesão celular RGD (Arg-Gly-Asp) o qual, provavelmente, media a sua ligação à superfície dos hemócitos (SRITUNYALUCKSANA; SÖDERHÄLL, 2000).

Em lagostins, a interação da β GBP com β -glicanas leva à formação de um complexo (β GBP-glicanas) que se liga a receptor(es) encontrado(s) na membrana dos hemócitos (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990; 1992). A partir dessa ligação observa-se o processo de ativação celular, que resulta no espraiamento e degranulação parcial dos hemócitos granulares (BARRACCO et al., 1991), liberando várias moléculas imunológicas, dentre elas as componentes do sistema proPO (CERENIUS et al., 1994; VARGAS-ALBORES et al., 1996)

A presença de sítios de ligação para o complexo β GBP-glicanas foi demonstrada na superfície dos hemócitos de *P. leniusculus* (BARRACCO et al., 1991), sendo o receptor purificado e caracterizado como um heterodímero protéico

com subunidades de 230 e 90 kDa (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1992). Curiosamente, a interação da proteína com o hemócito ocorre apenas quando a β GBP se encontra complexada às β -1,3-glicanas. Estudos posteriores identificaram um receptor superóxido dismutase (SOD) extracelular, ligada periféricamente à membrana plasmática, responsável pela ligação à molécula de adesão celular, peroxinectina, e também à β GBP complexada às β -1,3-glicanas nos hemócitos do lagostim (JOHANSSON et al., 1999).

O estudo de moléculas imunologicamente importantes, a exemplo da β GBP, pode ser particularmente relevante para um maior entendimento do sistema imune dos crustáceos e de sua capacidade em responder a injúrias provocadas por patógenos. Dessa forma, tais moléculas poderiam ser utilizadas futuramente como ferramentas biológicas para auxiliar no diagnóstico/controle das enfermidades, contribuindo assim para o sucesso dos cultivos.

Em Santa Catarina, o cultivo de espécies nativas de peneídeos foi substituído (1998) pelo cultivo da espécie exótica *L. vannamei*. Esse fato ocorreu como consequência da baixa conversão alimentar e do longo ciclo de vida apresentados pelas espécies nativas, o que resultava em um baixo rendimento econômico (SEIFFERT et al., 1998). *L. vannamei*, por sua vez, apresenta características zootécnicas propícias para o cativeiro, ainda que originalmente adaptado a temperaturas mais altas, e representa atualmente o peneídeo mais cultivado em todo o mundo (FAO, 2007). Devido ao seu interesse econômico, o sistema imune dessa espécie é amplamente investigado por vários grupos a nível internacional. Por outro lado, é de suma importância conhecer também os mecanismos de defesa desencadeados pelas espécies nativas.

Atualmente é reconhecido que o aumento da mortalidade de *L. vannamei* por WSSV está fortemente associado às baixas temperaturas da água nos cultivos (RODRIGUEZ et al., 2003; GRANJA et al., 2006). Efetivamente, nos meses em que ocorrem quedas bruscas de temperatura registra-se uma maior incidência da doença em *L. vannamei* cultivados em Santa Catarina (S. WINCLER DA COSTA, comunicação pessoal). Supostamente, essas condições ambientais propiciam a manifestação da doença nessa espécie, melhor adaptada às temperaturas superiores e cuja infecção pode se encontrar na forma latente.

Assim sendo, estudos sobre o sistema imune de espécies nativas, como *F. paulensis* e *L. schmitti*, adaptadas às condições ambientais locais, são de fundamental importância, pois elas poderiam vir a representar uma alternativa para o cultivo de *L. vannamei*, o qual, embora munido de características zootécnicas superiores, encontra-se fortemente ameaçado pelas viroses.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar e caracterizar a proteína de reconhecimento-padrão (PRP) que se liga a β -1,3-glicanas (β GBP) do plasma dos camarões nativos *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*, e avaliar a sua participação no sistema imune, através da ativação do sistema pró-fenoloxidase (proPO) e da sua capacidade aglutinante.

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar e purificar a proteína que se liga a β -1,3-glicanas (β GBP) dos camarões, através de precipitação por baixa força iônica seguida por cromatografia de troca aniônica
2. Identificar o peso molecular da β GBP por SDS-PAGE e *Western blot*, utilizando um anti-soro policlonal dirigido contra a β GBP de *L. vannamei*
3. Confirmar se a molécula purificada se trata da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti*, por espectrometria de massa (MALDI-TOF)
4. Avaliar a capacidade do complexo β GBP-glicanas de estimular e/ou aumentar a ativação do sistema pró-fenoloxidase (proPO), no sobrenadante de lisado de hemócitos
5. Avaliar a presença de uma atividade serino-proteásica da β GBP e/ou do complexo β GBP-glicanas relacionada à ativação do sistema proPO
6. Identificar a capacidade aglutinante da β GBP utilizando células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Nesse estudo foram utilizados camarões adultos e sub-adultos, de ambos os sexos, aparentemente saudáveis e em fase de intermuda, das espécies nativas *Farfantepenaeus paulensis* (Figura 1) e *Litopenaeus schmitti* (Figura 2). Os animais foram coletados na região de Santo Antônio de Lisboa, na baía Norte da Ilha de Santa Catarina, Florianópolis (27°28'30"S; 48°33'40"O).

Os camarões foram transportados para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, UFSC) e acondicionados em aquários de 40 l (n = 10) sob aeração constante (23 ± 4 °C; salinidade 32-34 ‰), sendo alimentados uma vez ao dia com ração específica.



Figura 1. Indivíduo adulto da espécie *Farfantepenaeus paulensis*. Barra = 1 cm



Figura 2. Indivíduos sub-adultos da espécie *Litopenaeus schmitti*. Barra = 1 cm

3.2 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa foi extraída em *pools* de 10 animais por espécie através de punção direta da região ventral, higienizada com álcool 70%, utilizando-se uma seringa estéril (1 ml) contendo solução anticoagulante MAS (solução de Alsever modificada: citrato de sódio 27 mM, NaCl 336 mM, glicose 115 mM, EDTA 9 mM, pH 7,0; RODRIGUEZ et al., 1995). Essa solução foi previamente filtrada (0,22 μ m) e acrescida de um *cocktail* de inibidores de proteases (Sigma; diluição 100x v/v).

A hemolinfa obtida (hemolinfa 2:1 MAS) foi centrifugada a 600 *xg* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante (plasma) foi coletado e mantido no gelo para processos de purificação protéica, enquanto o *pellet* celular foi utilizado para o preparo do sobrenadante de lisado de hemócitos (HLS; do inglês, *hemocyte lysate supernatant*).

3.3 Preparo do sobrenadante de lisado de hemócitos (HLS)

Os hemócitos foram lavados uma vez com MAS (500 *xg* por 5 min a 4 °C) e ressuspensos em 600 μ l de tampão cacodilato de sódio (cacodilato de sódio 10 mM, NaCl 330 mM, pH 7,5). A amostra foi então homogeneizada em aparelho ultrasonicador durante três intervalos de 7 s cada (22,5 kHz/50 W a 0 °C). Durante esse procedimento a amostra foi mantida no gelo. A obtenção do HLS foi realizada através de centrifugação a 20.000 *xg* por 30 min a 4 °C e coleta do sobrenadante (adaptado de PERAZZOLO et al., 2005).

3.4 Precipitação da β GBP por baixa força iônica – etapa de pré-purificação

Uma fração enriquecida da β GBP de ambas as espécies de camarões foi obtida por precipitação por baixa força iônica através de diálise *overnight* do plasma contra água destilada a 4 °C (adaptado de VARGAS-ALBORES et al., 1997). O material precipitado na membrana de diálise foi então recuperado, centrifugado a 9.000 *xg* por 10 min a 4 °C e ressolubilizado em TBS (Tris 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl_2 9,5 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 3 mM, pH 7,4), obtendo-se assim frações enriquecidas de β GBP.

3.5 Purificação da β GBP por cromatografia de troca aniônica

A purificação da β GBP de ambas as espécies de camarões foi realizada em colaboração com o Laboratório de Expressão Gênica e Interação DNA-Proteína,

Departamento de Bioquímica, UFSC, utilizando um sistema de cromatografia de fase líquida de alta pressão (HPLC/FPLC Akta Amersham). Alíquotas de 5 ml das frações enriquecidas de β GBP (1 mg/ml) foram previamente filtradas (0,22 μ m), diluídas 2 vezes em tampão Tris 20 mM pH 7,4 (1:1 v/v) e aplicadas em coluna Resource Q (1 ml, Amersham Pharmacia Biotech) pré-equilibrada com mesmo tampão.

As proteínas aderidas na coluna foram eluídas por meio de um gradiente linear de NaCl 0,10-0,35 M (em Tris 20 mM pH 7,4), recuperando-se alíquotas de 1 ml por fração. As frações correspondentes aos picos protéicos (280 nm) foram coletadas e concentradas 5 vezes por ultrafiltração (Amicon – Millipore; centrifugação a 3.500 $\times g$ por 10 min a 4 °C). A presença da β GBP foi verificada através de seu peso molecular em SDS-PAGE e por imunodeteção (*Western blot*).

3.6 Determinação da concentração protéica das amostras

A concentração protéica das frações enriquecidas e purificadas de β GBP, plasma e HLS dos camarões foi estimada pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão (BRADFORD, 1976).

3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Alíquotas de plasma ou β GBP purificada (~50-120 μ g, para perfis eletroforéticos; 5 μ g, para imunodeteção) foram diluídas em tampão de amostra (1:4 v/v; Tris-HCl 1 M pH 6,8, glicerol 50%, SDS 10%, azul de bromofenol 1%) e aplicadas em cada poço (25 μ l/poço) de um gel de poliacrilamida a 7,5%, sob condições redutoras e não-redutoras, de acordo com LAEMMLI (1970). Para condições redutoras, foi acrescido ao tampão de amostra β -mercaptoetanol 5% (β -ME 5%) e as amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C. A eletroforese foi realizada em sistema vertical de minigel (Mini Protean III, Bio-Rad) a 120 V, por aproximadamente 90 min. As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular em perfil eletroforético foram a miosina (196 kDa), β -galactosidase (128 kDa), BSA (84 kDa), anidrase carbônica (40 kDa) e inibidor de tripsina de soja (32 kDa) (Bio-Rad, marcador pré-corado). Para ensaios de eletrotransferência e *Western blot* foram utilizadas como marcadores de peso molecular as proteínas miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), frutose 6-fosfato quinase (84 kDa), BSA (66 kDa), desidrogenase glutâmica (54 kDa) e ovalbumina (45 kDa) (Sigma). Após a eletroforese, as bandas protéicas foram coradas com azul de

Coomassie R-250 0,1% ou imediatamente transferidas para membrana de nitrocelulose (*Western blot*).

3.8 Determinação do peso molecular da β GBP

O peso molecular (PM) das proteínas separadas por eletroforese foi estimado a partir do cálculo do fator de retenção (R_f ; do inglês, *retention factor*), o qual é baseado na relação entre a distância percorrida pela amostra e aquela percorrida pela frente de migração, como segue:

$$R_f = \frac{DP}{DT} \text{ (distância entre o depósito e a proteína)}$$
$$DT \text{ (distância entre o depósito e a frente de migração)}$$

As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular foram depositadas paralelamente às proteínas estudadas. Um gráfico de regressão linear do log do PM das proteínas-padrão em função do log do seu respectivo R_f foi construído e permitiu estimar o PM das proteínas estudadas.

3.9 Detecção e caracterização da β GBP por *Western Blot*

A imunodetecção e caracterização da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* foi realizada utilizando-se um anti-soro policlonal dirigido contra a β GBP do camarão *L. vannamei*, gentilmente cedido pela Dra. Gloria Yépiz Plascencia do Laboratório de Biologia Molecular de Organismos Acuáticos,

Hermosillo, México (YÉPIZ-PLASCENCIA et al., 2000). Após eletroforese, as proteínas separadas foram eletrotransferidas para membrana Hybond (Amersham) utilizando o sistema Transblot (Bio-Rad; Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8,3). As membranas contendo as proteínas imobilizadas (*blots*) foram saturadas com BSA 3% em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, KH_2PO_4 1,76 mM, pH 7,4) por 4 h a 25 °C, sob agitação. A seguir, as membranas foram lavadas 3 x 5 min com PBS acrescido de Tween 20 0,05% (PBS-T 0,05%) e incubadas com o anti- β GBP (1:10.000 em PBS-T 0,05%) por 1 h a 25 °C, sob agitação. Após a série de lavagens com PBS-T 0,3% (3 x 5 min), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (1:1.500 em PBS-T 0,3% acrescido de 0,5% de leite em pó desnatado) por 45 min a 25 °C, sob agitação. Por fim, o complexo antígeno-anticorpo foi revelado pela adição dos substratos enzimáticos Nitro Blue Tetrazolium (NBT; 0,30 mg/ml) e 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-Fosfato (BCIP; 0,15 mg/ml) em Tris

100 mM e MgSO_4 5 mM, de acordo com protocolo preconizado para o reagente (Sigma Fast).

3.10 Identificação de sequências aminoacídicas correspondentes à β GBP por espectrometria de massa

A determinação de sequências aminoacídicas internas foi realizada por espectrometria de massa (MALDI-TOF) em colaboração com o Laboratório de Expressão Gênica e Interação DNA-Proteína. Uma vez purificada e identificada a β GBP (SDS-PAGE e *Western blot*), as bandas protéicas correspondentes à proteína de interesse foram excisadas e eluídas do gel para, em seguida, serem submetidas à digestão enzimática com tripsina (WESTERMEIER; NAVEN, 2002). Os produtos de digestão foram analisados no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, utilizando espectrômetro Ettan MALDI-TOF PRO.

A identificação dos fragmentos peptídicos obtidos foi realizada a seguir, a partir da comparação de suas sequências aminoacídicas com outras disponíveis em bancos de dados públicos, utilizando o programa Mascot (Matrix Science; <http://www.matrixscience.com>). Os critérios para identificação positiva incluíram a pontuação (*scores*) fornecida pelo programa e a porcentagem de cobertura das sequências.

3.11 Ação da β GBP sobre a ativação do sistema proPO

A ativação do sistema proPO pela β GBP foi analisada utilizando-se amostras purificadas de β GBP de ambas as espécies, *F. paulensis* e *L. schmitti*, segundo protocolo adaptado de Duvic e Söderhäll (1990). Para tal, 50 μl de β GBP (~50 $\mu\text{g/ml}$) foram incubados com mesmo volume de laminarina (β -1,3 e β -1,6-glicanas extraídas da alga *Laminaria digitata*; Sigma; 1 mg/ml), em microplaca de 96 poços, por 5 min a 25 °C e sob leve agitação, a fim de formar o complexo β GBP-glicanas. Alíquotas de 50 μl de HLS (~1,5 mg/ml) foram adicionadas e a mistura incubada por 5 min a 25 °C. Para esse ensaio a amostra de HLS foi acrescida de CaCl_2 5 mM (concentração final). Após a incubação, 50 μl do substrato enzimático L-DOPA (3 mg/ml) foram adicionados a cada poço e a formação do pigmento vermelho-coral (DOPA-cromo) foi monitorada a 490 nm nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, em leitora de microplacas. O ensaio foi realizado em triplicata. Nos experimentos controle o

complexo β GBP-laminarina foi substituído por laminarina ou β GBP (controles negativos) ou tripsina (1 mg/ml; controle positivo). A atividade específica da PO foi expressa em unidade de enzima a partir da variação da absorbância, por minuto e por miligrama de proteínas totais do HLS (U/min/mg) (SÖDERHÄLL; HÄLL, 1984).

3.12 Ensaio de atividade serino-proteásica da β GBP

A atividade de serino-protease na fração purificada de β GBP foi avaliada segundo protocolo adaptado de Perazzolo e Barracco (1997). Nesse ensaio foram utilizados dois peptídeos cromogênicos BAPNA ($\text{N}\alpha$ -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida), sendo um deles substrato apenas para a tripsina (serino-protesase; Sigma B4875) e o segundo, substrato para a tripsina e outras proteases (Sigma B3133). Para tal, 50 μl de β GBP purificada ($\sim 50 \mu\text{g/ml}$) foram depositados em poços de uma microplaca de fundo chato e incubados com mesmo volume de laminarina (1 mg/ml), por 15 min a 27 °C, sob leve agitação, a fim de formar o complexo β GBP-glicanas. Em seguida, 50 μl de HLS ($\sim 1,5 \text{ mg/ml}$) foram adicionados a um grupo de replicatas, sendo ao outro acrescido tampão cacodilato de sódio. Após incubação por 5 min a 25 °C, foram adicionados a essa mistura 50 μl de BAPNA 2,2 mM em DMSO 10% (solubilizado em DMSO puro e posteriormente diluído em Tris 50 mM pH 7,4 a 27 °C). Nos experimentos controle o complexo β GBP-laminarina foi substituído por laminarina ou β GBP (controles negativos) ou tripsina (0,5 mg/ml; controle positivo). A eventual liberação de p-nitroanilida, indicando a proteólise pela β GBP-glicanas, foi determinada a 405 nm nos tempos 0, 10, 20, 30 e 40 min, em leitora de microplacas a 27 °C. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.13 Aglutinação de células de levedura mediada pela β GBP

Uma solução de leveduras liofilizadas *Saccharomyces cerevisiae* foi preparada em salina estéril (0,5 mg/ml em NaCl 0,15 M) através de três lavagens em NaCl 0,15M a 1000 $\times g$ por 10 min a 25 °C. As leveduras foram ressuspensas em TBS (Tris 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl_2 9,5 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 3 mM, pH 7,4), obtendo-se uma solução final de leveduras a 10^7 células/ml (contagem em câmara de Neubauer, de modo semelhante à realizada para leucócitos).

Alíquotas de 50 μl de β GBP purificada ($\sim 50 \mu\text{g/ml}$) foram diluídas seriadamente em tampão TBS em poços de uma microplaca (fundo em “U”) e incubadas com 50 μl

da suspensão de leveduras por 4 h a 25 °C, em câmara úmida. Nos experimentos controle a β GBP foi substituída por BSA (~50 μ g/ml) ou pelo complexo β GBP-laminarina. O complexo β GBP-laminarina foi previamente preparado a partir da incubação de β GBP purificada (~50 μ g/ml) e com o mesmo volume de laminarina (1 mg/ml) em agitador circular de tubos por 10 min a 25 °C. A aglutinação das leveduras foi monitorada em microscópio invertido (100x), a partir da observação de um padrão de aglutinação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação e identificação da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*

A β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* foi purificada a partir do plasma dos camarões em duas etapas consecutivas, por precipitação por baixa força iônica (diálise) seguida por cromatografia de troca aniônica. Antes da realização da etapa de diálise, estudos preliminares identificaram a fração contendo β GBP através de cromatografia de troca aniônica (gradiente linear NaCl 0-1 M), utilizando alíquotas de plasma total. Contudo, tal fração, eluída com aproximadamente NaCl 0,17 M, continha uma significativa contaminação pela proteína hemocianina (dados não apresentados).

A contaminação pela hemocianina observada nessa etapa inicial não é surpreendente, uma vez que essa molécula corresponde à proteína mais abundante na hemolinfa dos crustáceos, representando mais de 95% das proteínas totais do plasma (SELLOS et al., 1997). Ela é responsável pelo transporte de oxigênio e aparentemente está envolvida em respostas de defesa, através de suas atividades fenoloxidásica e antimicrobiana (*vide* revisão de DECKER; JAENICKE, 2004). Trata-se de uma proteína hexamérica que pode se associar e formar agregados de múltiplas subunidades, resultando em um peso molecular de 450 (2x6) a 3900 (8x6) kDa (HERSKOVITS, 1988). Em função da alta concentração em que se apresenta na hemolinfa de crustáceos, a hemocianina é comumente encontrada como contaminante em diversos ensaios de purificação, incluindo frações derivadas de cromatografia de troca iônica, utilizando plasma de camarões (PERAZZOLO et al., 2005).

O plasma de camarões marinhos é composto por diversas moléculas relacionadas aos processos de transporte de gases, defesa, digestão e reprodução do organismo. Entretanto, as proteínas predominantes no plasma, usualmente detectadas em SDS-PAGE, são a hemocianina (73 a 75 kDa) e a proteína de coagulação (180 kDa) (FIGUEROA-SOTO et al., 1997). Tal perfil também foi observado nesse estudo analisando amostras bastante diluídas de plasma de *F. paulensis* e *L. schmitti* (Figura 3A). A β GBP, por sua vez, representa apenas cerca de 1% das proteínas totais do plasma (RUIZ-VERDUGO et al., 1997), o que dificulta a sua visualização em SDS-PAGE de amostras diluídas de plasma.

Em vista desses resultados, empregou-se uma etapa prévia de purificação por precipitação por baixa força iônica, a qual permitiu a obtenção de frações concentradas de β GBP e a redução da contaminação por hemocianina. Por meio dessa técnica, as proteínas plasmáticas foram submetidas a uma baixa força iônica (diálise contra água destilada), ocorrendo a precipitação daquelas que apresentam um ponto isoelétrico (pI) próximo ao da solução utilizada (HARRIS, 1989). Dessa forma, apenas as proteínas plasmáticas sensíveis a esse método precipitaram, no caso a β GBP e parte da hemocianina (a maioria permaneceu em suspensão na membrana), além de outras proteínas não identificadas (Figura 3B), demonstrando tratar-se de uma etapa eficaz para a concentração e pré-purificação da β GBP a partir do plasma de camarões.

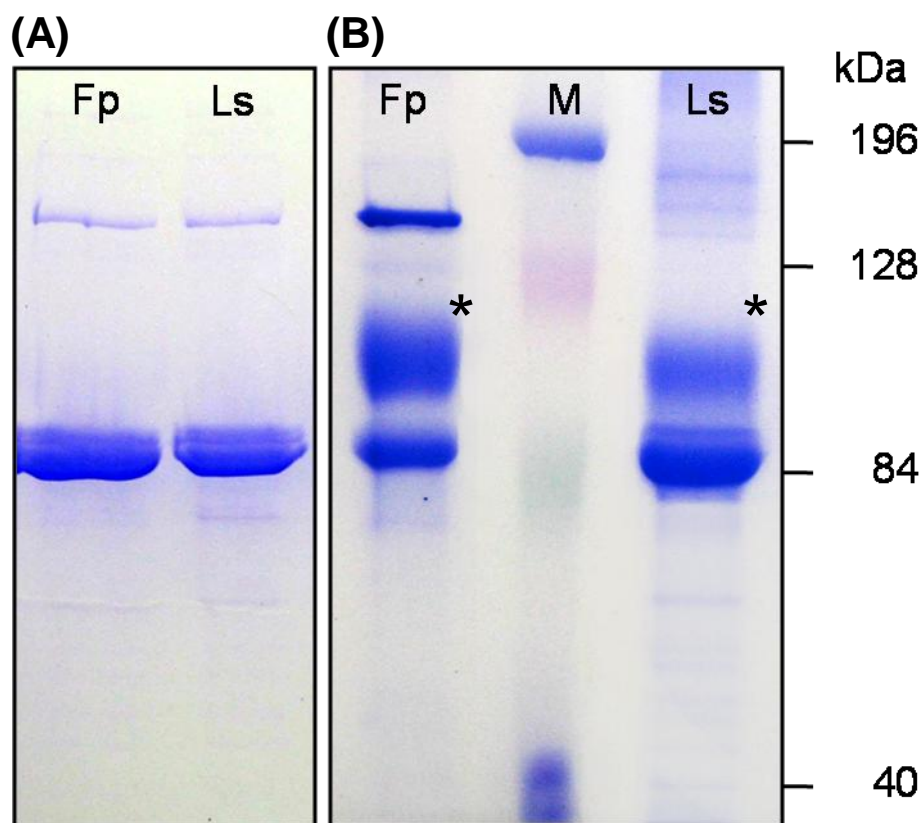


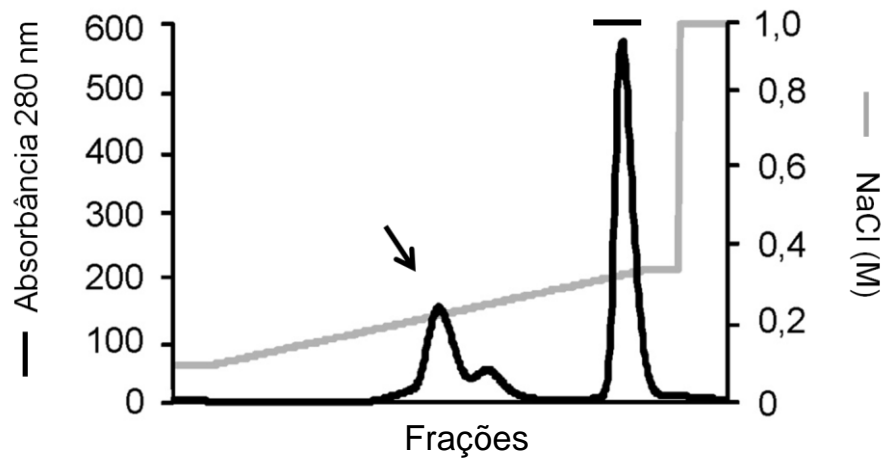
Figura 3. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 7,5% (β -ME 5%) do plasma total (A) e da fração enriquecida de β GBP obtida por precipitação por baixa força iônica a partir do plasma (B) de *Farfantepenaeus paulensis* (Fp) e *Litopenaeus schmitti* (Ls). As amostras de plasma contêm aproximadamente 50 μ g de proteína total, enquanto as frações enriquecidas contêm aproximadamente 100 μ g no caso de *F. paulensis* e 120 μ g de *L. schmitti*. (M) Marcadores de peso molecular. Os asteriscos (*) indicam a β GBP (~100 kDa).

A presença da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* na amostra resultante da precipitação por baixa força iônica pode ser reconhecida pela coloração amarelo-alaranjada do precipitado, constatada também em *F. californiensis* (VARGAS-ALBORES et al., 1996) e *L. vannamei* (VARGAS-ALBORES et al., 1997), utilizando a mesma técnica. Essa coloração provavelmente é resultado da composição lipídica da molécula, descrita para a β GBP de outras espécies de camarões (YÉPIZ-PLASCENCIA et al., 1998). A coloração amarelo-alaranjada comumente observada em lipoproteínas deve-se, principalmente, à presença de carotenóides e hidrocarbonetos (RUIZ-VERDUGO et al., 1997). Dessa forma, pode-se sugerir a presença desses compostos também na β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti*, uma vez que apresentaram coloração semelhante no precipitado resultante da técnica de diálise.

Uma vez obtidas as amostras enriquecidas de β GBP, seguiu-se a etapa de purificação por cromatografia de troca iônica. Foi encontrado um perfil cromatográfico semelhante para a β GBP de *F. paulensis* (Figura 4A) e *L. schmitti* (Figura 4B), após eluição das proteínas com gradiente linear de NaCl 0,10-0,35 M. As frações purificadas de β GBP de ambas as espécies de camarões foram eluídas com NaCl 0,22 M (Figura 4; seta), enquanto a hemocianina foi eluída posteriormente, com NaCl 0,30-0,35 M (Figura 4; barra).

Seguido à coleta das frações eluídas, as proteínas foram concentradas, suas concentrações determinadas e a pureza das amostras verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%; β -ME 5%). Uma única banda protéica de aproximadamente 100 kDa foi observada em condições redutoras (Figura 5A) e não-redutoras (dados não apresentados) em ambos os camarões. Esse resultado pode sugerir que a β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* corresponde a uma proteína monomérica.

(A)



(B)

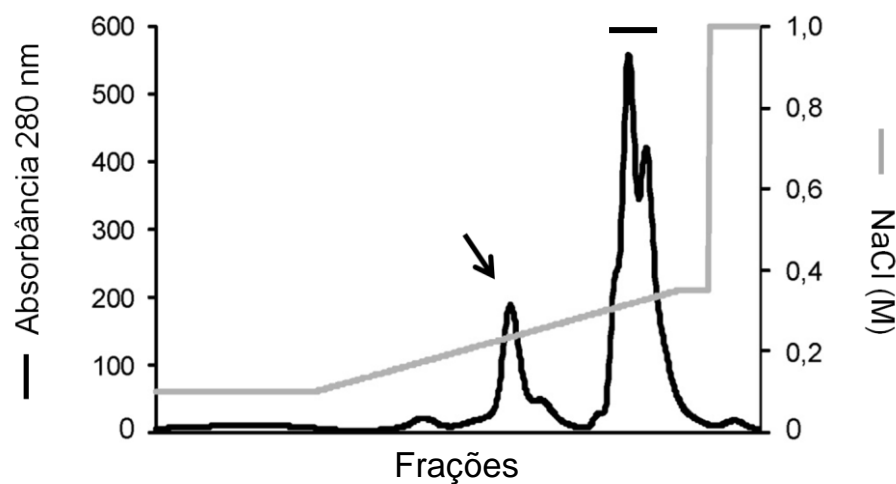


Figura 4. Purificação da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* (A) e *Litopenaeus schmitti* (B) por cromatografia de troca aniônica. Alíquotas da fração enriquecida de β GBP (5 mg) foram aplicadas em coluna Resource Q e as proteínas eluídas com gradiente linear de NaCl 0,10-0,35 M. As frações purificadas de β GBP foram eluídas com NaCl 0,22 M (seta). A barra (—) indica frações contendo hemocianina.

A identificação dessa proteína foi feita pelo anticorpo policlonal anti- β GBP de *L. vannamei* que reagiu fortemente tanto com uma única banda de ~100 kDa presente no plasma (Figura 6A), quanto com a única proteína eluída com NaCl 0,22 M (Figura 6B), indicando efetivamente ser essa a β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti*, respectivamente.

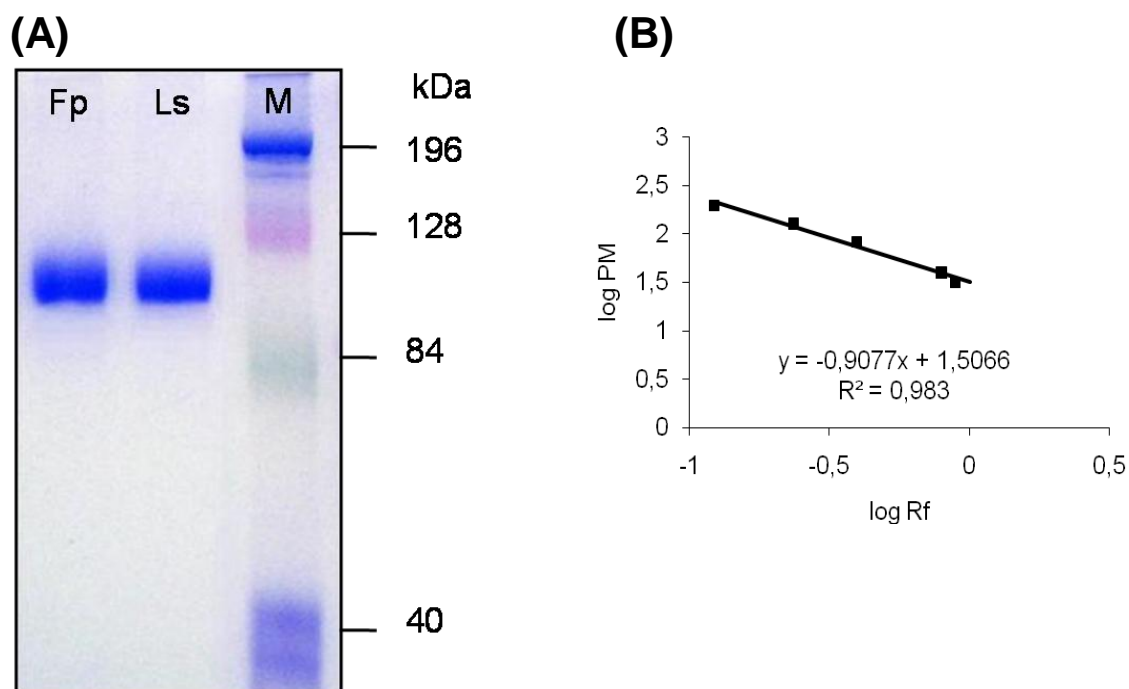


Figura 5. (A) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 7,5% (β-ME 5%) da βGBP purificada (50 µg) de *Farfantepenaeus paulensis* (Fp) e *Litopenaeus schmitti* (Ls), por cromatografia de troca aniônica. (M) Marcadores de peso molecular. (B) Curva de regressão linear utilizada para estimar o peso molecular da βGBP purificada.

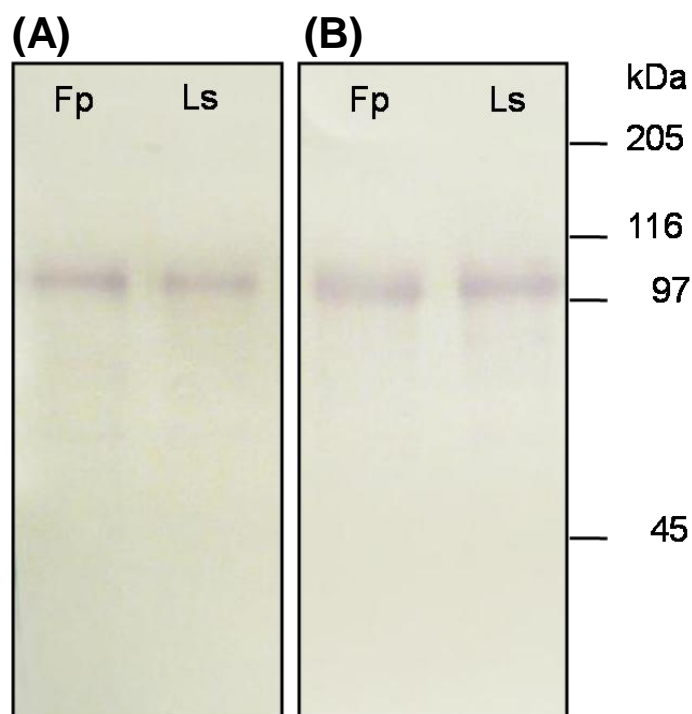


Figura 6. Immunodetecção da βGBP de *Farfantepenaeus paulensis* (Fp) e *Litopenaeus schmitti* (Ls) a partir de amostras de plasma (A) e frações de βGBP purificadas (B) por cromatografia de troca aniônica, utilizando anti-βGBP (1:10.000) de *Litopenaeus vannamei*. Cada poço contém aproximadamente 5 µg de proteína total. O marcador de peso molecular é apresentado à direita.

O peso molecular estimado para a β GBP dessas espécies nativas (Figura 5B) mostrou-se semelhante ao descrito para a β GBP de outras espécies de crustáceos, ou seja, entre 95 e 112 kDa (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990; CERENIUS et al., 1994; DUVIC; SÖDERHÄLL, 1993; THÖRNQVIST et al., 1994; VARGAS-ALBORES et al., 1996; 1997; YÉPIZ-PLASCENCIA et al., 1998; JIMENEZ-VEGA et al., 2002; ROMO-FIGUEROA et al., 2004).

Observou-se, contudo, uma pequena diferença na intensidade das bandas identificadas por *Western blot* entre as amostras do plasma e das frações purificadas (Figura 6), sendo levemente mais intensas nas últimas. Essa diferença pode estar relacionada à concentração da proteína nas amostras. Considerando que a β GBP corresponde cerca de 1% das proteínas totais do plasma de camarões, o sinal visualizado no plasma deveria se mostrar realmente menos intenso em comparação ao encontrado nas amostras purificadas e mais concentradas de β GBP (5 μ g de proteína). Esse fato também foi observado durante os próprios ensaios-teste do anticorpo utilizado nesse trabalho (YÉPIZ-PLASCENCIA et al., 2000).

Um resultado relevante encontrado no presente estudo diz respeito à alta especificidade do anticorpo anti- β GBP de *L. vannamei* (YÉPIZ-PLASCENCIA et al., 2000), que mesmo sendo dirigido contra uma proteína de outra espécie e utilizado em grandes diluições (1:10.000) foi ainda capaz de reconhecer de maneira inequívoca a β GBP de outros dois peneídeos nativos, *F. paulensis* e *L. schmitti*. Tal constatação mostra tanto a alta monoespecificidade do anticorpo, quanto a homologia significativa entre regiões com sequências e estruturas provavelmente muito semelhantes, entre as β GBP dessas três espécies de camarões marinhos.

Essa hipótese foi ainda reforçada pelos resultados obtidos através da análise de identidade da β GBP dos camarões nativos, por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Os produtos de digestão obtidos da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* apresentaram compatibilidade com algumas regiões da sequência aminoacídica deduzida de *L. vannamei*. A comparação dos peptídeos com a sequência identificada de *L. vannamei* mostrou que resíduos idênticos da β GBP de *F. paulensis* cobriram 10% da β GBP de *L. vannamei* (Figura 7), enquanto os de *L. schmitti* cobriram 16% da mesma molécula (Figura 8). Esses resultados são relevantes, uma vez que a identificação da proteína dos camarões nativos foi realizada a partir da comparação da relação massa/carga (m/z) dos peptídeos

obtidos com sequências aminoacídicas disponíveis em bancos de dados, onde apenas a sequência da β GBP de *L. vannamei* apresentou homologia.

O reconhecimento, em ambas as espécies, de peptídeos idênticos à estrutura primária da β GBP de *L. vannamei* indica, ainda, uma homologia e similaridade relativas entre a β GBP desses peneídeos. A análise da proteína purificada por espectrometria de massa, bem como os scores identificados durante a análise (147 e 237 para a β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti*, respectivamente), reforçam os resultados encontrados por *Western blot* e indicam fortemente tratar-se da β GBP desses camarões.

1	MSFDLTTPFD	VIKTVSLAR	YSWTSQKGA	TLNITYNDKN	FVLSSSLQLS
51	TRASNITFQA	TTPFEGFQNS	FIEIKYDIDN	REELLASRV	VDDHSYSFVV
101	GGYIEDKLAV	FKWNLNSPLT	GWTDKAFVAK	IDLSSSENKNL	EISLEKEGDL
151	KAIAVSGKFI	GSTLDFNLRT	PFRGLNFFNV	FGSLN RSKRS	LEMRRMMNDAG
201	<u>QASLAGNFNS</u>	<u>LRFNMKTPFE</u>	<u>RAEQISWEVT</u>	KTGEGSYKAE	WR RNDNYATF
251	TIEK DVSKQS	FDLNIKSEFR	GWEILALTGR	LDQETKQAYL	SGAINEQKIT
301	VTGSGSITNK	IK FSMTIETP	YENYRQVKAQ	LNIAKRKNAI	KLEASSSSSD
351	FHLLWSRSGS	GLEAHLIVPN	SRQNTAISIN	LTPTQGKITI	TSRFEPIDY
401	LQEHVNLGQ	NEITADHIK	LNGHEVFKMD	FERNAPEQKV	HLEIHTHVAE
451	RHTTIHFHRE	GFSKLNFLFK	REVPQYGEKH	FKVDITGSGA	LPQKGALDIV
501	VENTFREPAA	TINARVEVDR	TGARKKIMLE	VSPRQSRVYI	FNLEYIADLE
551	SPQHGDFTLK	ITTPNNSPWQ	NISGNWNVED	PNDATITFTV	GNVTYNAGK
601	LTLRESTMIL	SSTDPSAENI	YLQWKFERNG	DTKDYFLKLG	RKSRYGMLKL
651	TGTITDIAHV	<i>DIEGGFKAGP</i>	<i>FMPNEFLFTS</i>	MWGK SNGVVT	GEGTFDYGNY
701	HGSHRLVKFE	RNAERKSASF	EWSATSNIPQ	YNSVSVSGNY	DFNHKVVIFV
751	VINADGRESK	IDINIADINP	TSSRNTAMIS	IPLLGPTFKR	TELTVSHDFS
801	HPNRK SISAV	AKFGRSESEI	NAKWNRSDGF	DTLEGNIKAE	SRFLGDFLIN
851	VRYDMSNIAD	AHAEDVDLRT	TTDGDKKEFK	LNWTRKSTDD	HLENEMVFDS
901	NFETLSHARA	YANADYGGIF	KLLSGLDWDD	KKISLTLEVR	KNKISGILTT
951	PFEGFETLEI	DLQYKLTGKD	KSVKATYQRG	DRKASFNMEM	STKGKKGGSF
1001	KVDLTTPFEV	VKNLHIDGQY	ENK VAQINYQ	RNDIQMNFG	KANIKSSKAS
1051	FDISFTPPSG	QNIRIAASYD	VQDFIDGTGD	EEKELASLSL	EFEGNSMDFS
1101	LHGFRNDDRL	<i>YVMIHGTSSF</i>	<i>AVLKMFLHLKL</i>	DSELNTEARD	GTFELTFNDF
1151	KFNVSNHFER	RANNGYYFRS	KIESTLTPLP	ALIIGLGREG	QERIITIGYG
1201	EDKEITFSVK	GKNNFLSGFS	GKVDIPSIGY	EGVEYDSDYS	FPGDNHLQIK
1251	VEIDLNENGQ	EVEATFFLDS	EGIKARLSSA	VLGDHSL RVR	RSVAPDGFYA
1301	EAGLDDYNLK	LRGGFKNEDT	ARGVQLEGEV	FGKR FLIDTL	FQSEGKRYSE
1351	GKLIHITPFH	GMEKMGGFLT	WSNQNKKIMA	HAELHLPSTY	TPTITGEISL
1401	DLKKKINGYV	TLDVAGEEFT	LKCNLAGSSI	SQGYTGSLEF	YTTIPCCITC
1451	CGDR				

Figura 7. Estrutura primária da β GBP de *Litopenaeus vannamei*. Resíduos idênticos da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis*, obtidos a partir da digestão com tripsina e análise em MALDI-TOF, são destacados em vermelho. A sequência N-terminal encontra-se sublinhada, as sequências de clivagem R(K)/X/X/R(K) em negrito, os domínios semelhantes às glucanases em itálico e o motivo de adesão celular RGD sublinhado por linha pontilhada.

```

1 MSFDLTTPFD VIKTVLSLAR YSWTTSQKGA TLNITYNDKN FVLSSSLQLS
51 TRASNITFQA TTPFEGFQNS FIEIKYDIDN REELLASRVS VDDHSYSFV
101 GGYIEDKLAV FKWNLNSPLT GWTDAKFVAK IDLSSSENKNL EISLEKEGDL
151 KAIAVSGKFI GSTLDFNLRT PFRGLNNFNV FGSLNRSKRS LEMRMMNDAG
201 QASLAGNFNS LRFNMKTPFE RAEQISWEVT KTGEGSYKAE WRRNDNYATF
251 TIEKDVSKQS FDLNIKSEFR GWEILALTGR LDQETKQAYL SGAINEQKIT
301 VTGSGSITNK IKFSMTIETP YENYRQVKAQ LNYAKRKNAI KLEASSSSSD
351 FHLLWSRSGS GLEAHLIVPN SRQNTTEISIN LTPTQGKITI TSRFEPIRDY
401 LQEYHVNLGQ NEITADHIIK LNGHEVFKMD FERNAPQKV HLEIHTHVAE
451 RHTTIHFHRE GFSKLNFLFK REVDPQYGEKH FKVDITGSGA LPQKGALDIV
501 VENTFREPAPK TINARVEVDR TGARKKIMLE VSPRQSRVYI FNLEYIADLE
551 SPQHGDFTLK ITTPNNSPWQ NISGNWNVED PNDATITFTV GNVTYNAKGK
601 LTLRESTMIL SSTDPSAENI YLQWKFERNG DTKDYFLKLG RKSRYGMLKL
651 TGTITDIAHV DIEGGFKAGP FMPNEFLFTS MWGKSNGVVT GEGTFDYGNY
701 HGSHRLVKFE RNAERKSASF EWSATSNIPQ YNSVSVSGNY DFNHKVVIFV
751 VINADGRESK IDINIADINP TSSRNTAMIS IPLLGPTFKR TELTVSHDFS
801 HPNRKSISAV AKFGRSESEFI NAKWNRSDGF DTLEGNIEAK SRFLGDFLIN
851 VRYDMSNIAD AHAEDVDYLRT TTDGDKKEFK LNWTRKSTDD HLENEMVDFS
901 NFETLSHARA YANADYGGIF KLLSGLDWDD KKISLTLEVR KNKISGILTT
951 PFEGFETLEI DLQYKLTGKD KSVKATYQRRG DRKASFNMEM STKGKKGGSF
1001 KVDLTTPFEV VKNLHIDGQY ENKVAQINYQ RNDIQMNFNG KANIKSSKAS
1051 FDISFTPPSG QNIRIAASYD VQDFIDGTGD EEKELASLSL EFEGNSMDFS
1101 LHGFRNDRL YVMIHGTSSF AVLKMFHLKL DSELNTEARD GTFELTFNDF
1151 KFNVSNHFER RANNGYYFRS KESTLTPLP ALIIGLGREG QERIITIGYG
1201 EDKEITFSVK GKNFLSGFS GKVDIPSIGY EGVEYDVDSY FPGDNHLQIK
1251 VEIDLNENGQ EVEATFFLDS EGIKARLSSA VLGDHSLRVR RSVAPDGFYA
1301 EAGLDDYNLK LRGGFKNEDT ARGVQLEGEV FGKRFLIDTL FQSEGKRYSE
1351 GKLIIHTPFH GMEKMGGLFT WSNQNKIMA HAELHLPSYT TPTITGEISL
1401 DLKKKINGYV TLDVAGEEFT LKCNLAGSSI SQGYTGSLEF YTTIPCCITC
1451 CGDR

```

Figura 8. Estrutura primária da β GBP de *Litopenaeus vannamei*. Resíduos idênticos da β GBP de *Litopenaeus schmitti*, obtidos a partir da digestão com tripsina e análise em MALDI-TOF, são destacados em vermelho. A sequência N-terminal encontra-se sublinhada, as sequências de clivagem R(K)/X/X/R(K) em negrito, os domínios semelhantes às glucanases em itálico e o motivo de adesão celular RGD sublinhado por linha pontilhada.

Outro fato interessante são os valores mais altos de cobertura e score encontrados na análise dos peptídeos da β GBP de *L. schmitti*, os quais podem provavelmente estar relacionados com a maior proximidade filogenética desse peneídeo com a espécie comparada (*L. vannamei*). Por tratar-se de espécies de mesmo gênero (*Litopenaeus*), tais moléculas devem compartilhar um maior número de regiões similares, refletida na maior homologia encontrada, quando comparado com *F. paulensis*.

A β GBP de *L. vannamei* apresenta domínios e regiões importantes envolvidos na estrutura e na atividade biológica da proteína, os quais se mostram conservados quando comparados à sequência aminoacídica deduzida de *P. leniusculus* (ROMO-FIGUEROA et al., 2004). Dentre essas sequências, pode-se citar a região N-terminal (aminoácidos 198-222); o motivo RGD (aminoácidos 979-981) envolvido na adesão

celular; os domínios semelhantes às glucanases bacterianas (aminoácidos 653-673 e 1108-1128); e as sequências R(K)/X/X/R(K) (aminoácidos 186-189 e 1288-1291), possíveis sítios de processamento proteolítico para a produção da proteína madura (Figuras 7 e 8). No entanto, a sequência e a localização dos sítios de ligação às β -1,3-glicanas e ao receptor do hemócito ainda não foram determinadas.

No presente estudo, os resíduos da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* idênticos à sequência aminoacídica deduzida da β GBP de *L. vannamei* foram analisados quanto à sua localização, a fim de verificar a presença de regiões e/ou domínios conservados. Curiosamente, tanto em *F. paulensis* (aminoácidos 1335-1347; Figura 7) quanto em *L. schmitti* (aminoácidos 1348-1364 e 1378-1403; Figura 8) foram encontrados peptídeos localizados posteriormente à sequência RVRR [R(K)/X/X/R(K)], considerada o possível sítio de clivagem da região C-terminal no processamento da proteína madura (ROMO-FIGUEROA et al., 2004). A presença e o reconhecimento de produtos de digestão da β GBP em região posterior a essa sequência poderiam indicar que a proteína madura ainda apresente em sua estrutura a sequência que seria retirada durante o processo de maturação, contrariando assim o sugerido por Romo-Figueroa e colaboradores (2004). Estudos futuros envolvendo o sequenciamento da região C-terminal da proteína purificada de *F. paulensis* e *L. schmitti* poderão elucidar essa questão.

Foram identificados, ainda, duas regiões aminoacídicas em *L. schmitti* (aminoácidos 972-979 e 983-993) interceptando o motivo de adesão celular RGD da β GBP de *L. vannamei* (SVKATYQRGD~~RG~~DRKASFNMEMSTK; Figura 8). Esse motivo mostra-se altamente conservado, em moléculas envolvidas na adesão celular e nossos resultados sugerem fortemente que o mesmo também esteja presente na sequência da β GBP de *L. schmitti*, como descrito em *P. leniusculus* e *L. vannamei* (CERENIUS et al., 1994; ROMO-FIGUEROA et al., 2004).

Até o momento, apenas as sequências aminoacídicas da β GBP do lagostim *P. leniusculus* (CERENIUS et al., 1994) e do camarão *L. vannamei* (ROMO-FIGUEROA et al., 2004) são conhecidas (dedução a partir do cDNA). A β GBP de *L. vannamei* apresenta 54% de identidade com a de *P. leniusculus* (ROMO-FIGUEROA et al., 2004). No entanto, não foi observada similaridade entre os produtos de digestão da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* e a sequência aminoacídica deduzida da β GBP do lagostim. Tal resultado indica que os fragmentos obtidos nas espécies nativas não correspondem às sequências da β GBP de *L. vannamei* idênticas (54%) àquela de *P.*

leniusculus. Além disso, pode-se inferir, como esperado, uma maior homologia entre as β GBPs dos peneídeos em relação à do lagostim. Esse resultado não é surpreendente, uma vez que peneídeos e lagostins, apesar de pertencerem à mesma Ordem, apresentam diferenças fisiológicas fundamentais decorrentes, em parte, dos seus respectivos habitats, além da distância filogenética maior encontrada entre esses animais em relação aos de mesma família (Penaeidae). Ainda, enquanto peneídeos são animais marinhos, lagostins são crustáceos de água doce, o que não seria surpreendente se evolutivamente esses animais desenvolvessem moléculas funcionais estruturalmente distintas. Isso reflete na prática que, embora a β GBP de camarões e lagostins sejam moléculas supostamente idênticas do ponto de vista funcional (*vide* revisão de VARGAS-ALBORES; YÉPIZ-PLASCENCIA, 2000), elas apresentam algumas diferenças estruturais como já ficou demonstrado pela análise de 54% de identidade, realizada por Romo-Figueroa e colaboradores (2004).

4.2 Participação da β GBP no sistema imune de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*

Uma vez purificada e caracterizada parcialmente a β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti*, essas foram utilizadas em ensaios funcionais, a fim de verificar a participação das mesmas no sistema imune, através da ativação do sistema proPO e da aglutinação de células revestidas com β -glicanas (leveduras).

4.2.1 Ativação do sistema proPO

A participação da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* na ativação do sistema proPO desses animais foi verificada utilizando-se o sobrenadante do lisado de hemócitos (HLS), o qual contém as pró-formas enzimáticas (proPO e ppA) desse sistema de defesa, entre outras moléculas imunoefetoras. Uma vez que o sistema proPO de *P. leniusculus* e *L. vannamei* é somente ativado pelo complexo β GBP-glicanas (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990; VARGAS-ALBORES et al., 1996), foram então realizadas análises *in vitro* utilizando a β GBP complexada com laminarina (β -1,3 e β -1,6-glicanas), a fim de verificar a ocorrência do mesmo fenômeno nas duas espécies nativas em estudo.

A β GBP quando incubada com laminarina (complexo β GBP-glicanas) foi capaz de aumentar em cerca de 3 vezes a ativação do sistema proPO em *F. paulensis* ($395,56 \pm 8,89$ U/min/mg) e em *L. schmitti* ($422,22 \pm 11,56$ U/min/mg) em relação à

incubação com β GBP ou laminarina não-complexadas (Figura 9). No entanto, a atividade específica da PO também foi induzida apenas pela laminarina ($148,44 \pm 26,67$ e $113,33 \pm 30,89$ U/min/mg) e pela β GBP ($129,78 \pm 4,44$ e $171,11 \pm 3,11$ U/min/mg) (Figura 9), apesar dessa indução ter sido menos expressiva que a observada pelo complexo β GBP-laminarina.

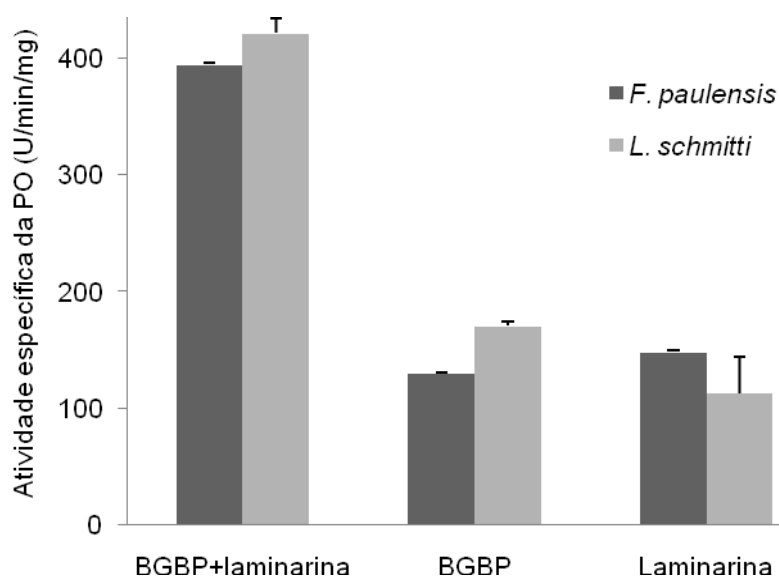


Figura 9. Atividade específica da PO aos 5 min de reação, após incubação do HLS com β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti* complexada com laminarina. Nos controles, utilizou-se somente laminarina (1 mg/ml) ou β GBP (~ 50 μ g/ml). O ensaio foi realizado em triplicata. Dados representam média \pm DP.

Classicamente é reconhecido que a β GBP *per se* não é capaz de induzir uma ativação do sistema proPO em lagostim e que essa ativação seria exclusiva do complexo β GBP-laminarina (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990). Contudo, Duvic e Söderhäll (1990) relataram que o sistema proPO do lagostim *P. leniusculus* era parcialmente ativado tanto pela laminarina quanto pela β GBP isoladas em cerca de 4 vezes menos que o complexo β GBP-laminarina. No caso de camarões, em um estudo com *L. vannamei*, Vargas-Albores e colaboradores (1996) mostraram que a laminarina isolada foi também capaz de induzir a ativação do sistema proPO cerca de 2 vezes menos em relação ao complexo β GBP-laminarina. Já a ativação pela β GBP sozinha não foi verificada nesse estudo, dificultando assim maiores

comparações e a afirmação de que a β GBP *per se* de fato não seja capaz de induzir a ativação do sistema proPO nesses animais. Vale ressaltar que esses resultados não são comentados por ambos os autores e nenhuma hipótese é levantada para explicar tal fenômeno.

O aumento da ativação do sistema proPO desencadeado pela laminarina e β GBP não-complexadas pode ser resultado da presença no HLS de possíveis moléculas e/ou receptores que em condições *in vitro* ativariam o sistema de uma forma ainda não conhecida.

No entanto, ainda que observado o leve aumento na ativação do sistema proPO desencadeado pela laminarina e β GBP, a ativação 3 vezes superior induzida pelo complexo β GBP-laminarina sugere que esse seja fundamental para uma ativação fortemente amplificada do sistema, como descrito para outras espécies de crustáceos (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990; VARGAS-ALBORES et al., 1996). Sendo assim, permanecem desconhecidas as causas para a ativação parcial do sistema proPO dos camarões nativos pela laminarina ou β GBP não-complexadas e estudos futuros devem ser realizados para elucidar essa questão.

Uma vez constatado o aumento da ativação do sistema proPO pelo complexo β GBP-laminarina e sabendo que esse sistema é ativado a partir de clivagens consecutivas mediadas pela ação de serino-proteases, foi então realizado um ensaio funcional a fim de identificar a possível atividade serino-proteásica desse complexo. Paralelamente, verificou-se a presença da mesma propriedade na β GBP isolada, com o intuito de compreender a ativação parcial do sistema proPO induzida por essa proteína na forma não-complexada. Esse ensaio poderia vir a identificar uma participação da indireta β GBP e/ou do complexo β GBP-laminarina sobre a ativação do sistema proPO, por meio da ativação, por exemplo, de serino-proteases intracelulares.

No entanto, nenhuma atividade serino-proteásica foi observada em ambas as amostras de *F. paulensis* e *L. schmitti*, seja na ausência ou na presença de HLS (Tabela 1), sendo a clivagem do BAPNA observada apenas no controle positivo da reação (tripsina).

Tabela 1. Avaliação da atividade serino-proteásica da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*, utilizando o peptídeo cromogênico BAPNA (A= 405 nm).

<i>F. paulensis</i>	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
β GBP	0,169 \pm 0,007	0,173 \pm 0,006	0,175 \pm 0,006	0,176 \pm 0,006	0,176 \pm 0,005
β GBP+HLS	0,180 \pm 0,005	0,192 \pm 0,006	0,193 \pm 0,005	0,195 \pm 0,005	0,196 \pm 0,006
β GBP+laminarina ^a	0,078 \pm 0,010	0,078 \pm 0,010	0,080 \pm 0,011	0,079 \pm 0,010	0,081 \pm 0,011
β GBP+laminarina ^a +HLS	0,252 \pm 0,016	0,256 \pm 0,010	0,254 \pm 0,008	0,249 \pm 0,008	0,245 \pm 0,006
Laminarina+HLS	0,147 \pm 0,012	0,170 \pm 0,016	0,172 \pm 0,017	0,170 \pm 0,017	0,170 \pm 0,018
Tripsina^b+HLS	0,101\pm0,013	0,408\pm0,007	0,564\pm0,016	0,640\pm0,024	0,681\pm0,028
<i>L. schmitti</i>	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
β GBP	0,128 \pm 0,017	0,130 \pm 0,017	0,131 \pm 0,018	0,131 \pm 0,018	0,131 \pm 0,017
β GBP+HLS	0,161 \pm 0,008	0,173 \pm 0,007	0,175 \pm 0,008	0,175 \pm 0,006	0,176 \pm 0,007
β GBP+laminarina ^a	0,094 \pm 0,006	0,098 \pm 0,006	0,100 \pm 0,006	0,102 \pm 0,006	0,102 \pm 0,006
β GBP+laminarina ^a +HLS	0,205 \pm 0,013	0,207 \pm 0,013	0,208 \pm 0,014	0,208 \pm 0,013	0,209 \pm 0,012
Laminarina+HLS	0,169 \pm 0,002	0,173 \pm 0,003	0,173 \pm 0,003	0,175 \pm 0,003	0,177 \pm 0,005
Tripsina^b+HLS	0,209\pm0,012	0,860\pm0,047	1,326\pm0,048	1,600\pm0,038	1,759\pm0,034

^a β GBP e laminarina foram incubadas previamente para formação do complexo β GBP-laminarina;

^b Tripsina (serino-protease) corresponde ao controle positivo da reação;

BAPNA (2,2 mM) (B4875, Sigma) foi adicionado a todas as amostras. O ensaio foi realizado em triplicata. Dados representam média \pm DP.

Convém lembrar que nesse ensaio foram utilizados dois diferentes BAPNAs. Os primeiros experimentos foram realizados empregando BAPNA B4875 (Sigma) o qual atua como substrato específico para a serino-protease tripsina. Não se obtendo nenhum resultado positivo a partir desse, utilizou-se então outro reagente BAPNA (B3133; Sigma), que além de atuar como substrato para a tripsina pode também ser clivado por outras proteases, não se restringindo, assim, apenas à ação de serino-proteases. Todavia, de maneira semelhante, nenhuma atividade proteolítica foi observada nas amostras de ambas as espécies (dados não apresentados), sugerindo assim que os substratos utilizados possam não ser os mais adequados para verificar o processo de clivagem pelas serino-proteases endógenas presentes no sistema, ou, ainda, que a ativação do sistema proPO a partir do complexo β GBP-glicanas requeira outras moléculas e/ou mecanismos ausentes em sistemas *in vitro*, como o utilizado nesse estudo.

No entanto, diferentemente do presente estudo, uma atividade peptidásica do complexo β GBP-laminarina foi reportada em *P. leniusculus*, mediante utilização de outro substrato cromogênico, o benzoil-Ile-Glu-(piperidil)-Gly-Arg-p-nitroanilida (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990). Nesse estudo ficou demonstrada a participação do complexo na ativação do sistema proPO, bem como o envolvimento do mesmo na

ativação de serino-proteases relacionadas. Além disso, nenhuma atividade proteolítica foi encontrada na β GBP do lagostim, corroborando a necessidade da presença da laminarina complexada para que ocorra o desencadeamento dessa resposta de defesa.

Em relação aos resultados encontrados no presente estudo, a participação do complexo β GBP-laminarina na ativação do sistema proPO de *F. paulensis* e *L. schmitti* através de uma atividade proteásica permanecem inconclusivos. Ainda que o complexo β GBP-laminarina tenha induzido a ativação do sistema proPO, não foi demonstrado nesse estudo que essa ativação seja decorrente de atividade serino-proteásica. Dessa forma, a participação da β GBP e/ou do complexo β GBP-laminarina no sistema de ativação da proPO pode estar relacionada a outras moléculas e/ou receptores imunológicos, não identificados nesse estudo e não acessados através das condições experimentais aqui realizadas. Portanto, o mecanismo de ativação do sistema proPO pela ação da β GBP em *F. paulensis* e *L. schmitti* permanece não elucidado e estudos futuros deverão ser realizados para esclarecer essa questão.

4.2.2 Propriedade aglutinante da β GBP

A fim de verificar a presença de propriedade aglutinante da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti*, uma vez que essa molécula se liga a carboidratos, foi realizado um ensaio biológico utilizando células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A β GBP de ambas as espécies de camarões foi capaz de aglutinar razoavelmente *in vitro* células de leveduras, como ilustrado na Figura 10. Observou-se a formação de agregados celulares decorrentes da incubação das leveduras com a β GBP purificada (Figura 10A e D), quando comparado aos controles (complexo β GBP-laminarina ou BSA). No entanto, uma aglutinação de leveduras em menor escala foi também encontrada no ensaio contendo o complexo β GBP-laminarina (Figura 10B e E). Esse resultado se deve provavelmente à presença de algumas moléculas de β GBP livres, ou seja, que não se ligaram à laminarina durante a incubação prévia necessária para formação do complexo.

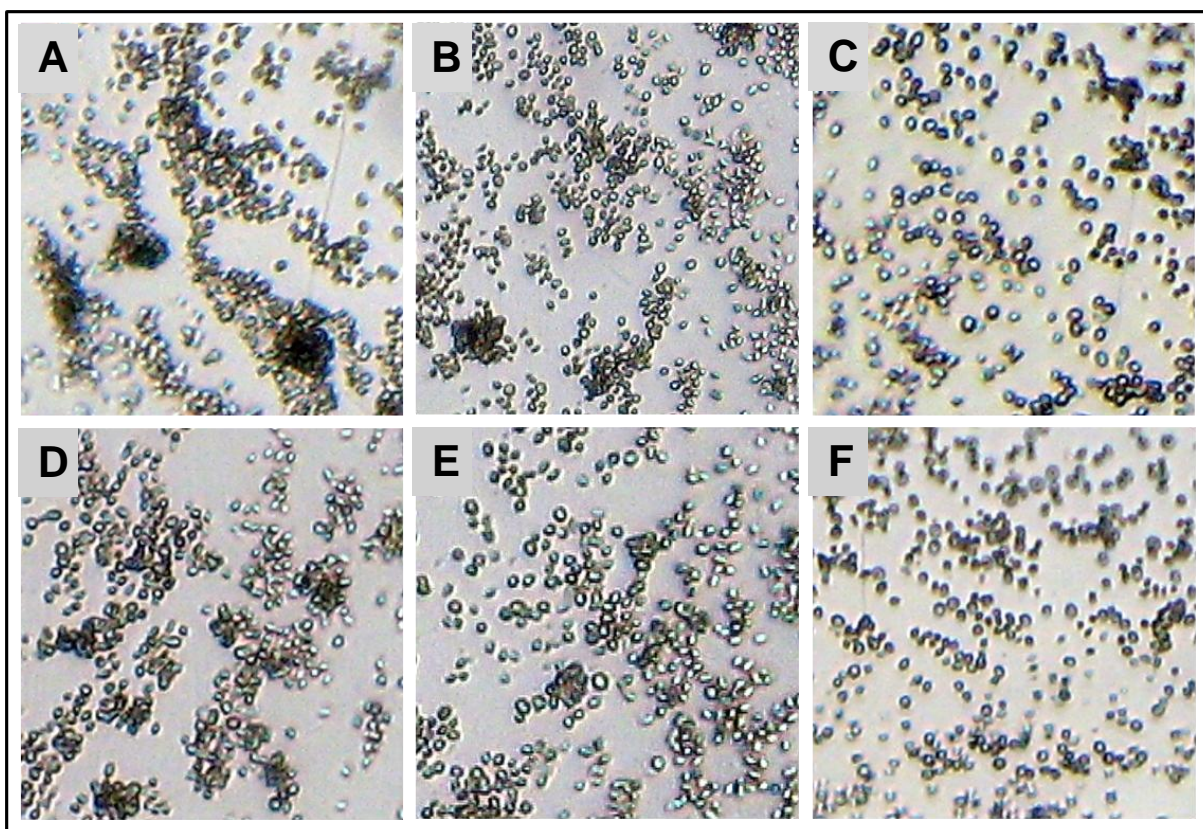


Figura 10. Aglutinação de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (10^7 células/ml) após incubação com β GBP (~ 50 μ g/ml) de *Farfantepenaeus paulensis* (A) e *Litopenaeus schmitti* (D). Nos experimentos controle utilizou-se o complexo β GBP-laminarina (B) e (E) ou BSA (C) e (F).

A superfície celular das leveduras é composta, dentre outros componentes, por β -1,3-glicanas, carboidrato ligante da β GBP (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990; ROMO-FIGUEROA et al., 2004). Logo, o reconhecimento e ligação da β GBP a β -1,3-glicanas, permite a aglutinação desses microrganismos.

Estudos prévios verificaram a capacidade aglutinante da β GBP de *P. leniusculus* (DUVIC; SÖDERHÄLL, 1990) e *L. vannamei* (JIMENEZ-VEJA et al., 2002), através de ensaios de hemaglutinação, não utilizando leveduras, como em nosso estudo. A hemaglutinação é resultado da ação de lectinas/aglutininas, as quais correspondem a PRPs plasmáticas capazes de se ligar especificamente a carboidratos da superfície de diferentes células, causando sua aglutinação. Essa propriedade deriva do fato dessas moléculas serem pelo menos bivalentes, apresentando dois ou mais sítios de ligação (BARRACCO et al., 2008). Dessa forma, o reconhecimento e ligação de aglutininas a carboidratos encontrados na

superfície de eritrócitos, como açúcares N-acetilados, causam a aglutinação dessas células, caracterizando assim o processo de hemaglutinação.

A β GBP de *P. leniusculus* mostrou-se incapaz de aglutinar eritrócitos de diferentes animais (coelho, galo e cavalo), semelhantemente ao encontrado para a β GBP de *L. vannamei* que não aglutinou eritrócitos humanos ou de coelho. Apesar de não promover a aglutinação de eritrócitos, tais resultados não descartaram a possibilidade da β GBP se ligar às células, apresentando assim estrutura semelhante a uma lectina monovalente (JIMENEZ-VEGA et al., 2002).

Esses resultados não são de todo surpreendentes, uma vez que a verificação de hemaglutinação de eritrócitos poderia informar que a β GBP dos crustáceos, como as lectinas, é capaz de reconhecer e se ligar a açúcares de origem animal, além das β -1,3-glicanas de fungos. No entanto, ambos os trabalhos apenas confirmaram a especificidade dessa proteína, demonstrando que as β -1,3-glicanas correspondem ao ligante da β GBP.

No presente estudo, os resultados demonstram a ocorrência da ligação da β GBP dos peneídeos nativos com β -1,3-glicanas da superfície celular de leveduras, refletida na aglutinação aqui observada. Pode-se sugerir, ainda, a presença de pelo menos dois sítios de ligação ao composto microbiano, estrutura essa considerada requisito básico para induzir a aglutinação. Sendo assim, a β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* pode apresentar, portanto, uma estrutura no mínimo bivalente semelhante à encontrada em outras aglutininas (*vide* revisão MARQUES; BARRACCO, 2000).

A ocorrência de um terceiro sítio de ligação, esse destinado à interação do complexo β GBP-glicanas a receptores dos hemócitos, pode conferir à molécula a propriedade de opsonina, facilitando o processo de fagocitose. Essa atividade já foi demonstrada para a β GBP de outros crustáceos, como *P. leniusculus* (CERENIUS et al., 1994) e *C. maenas* (THÖRNQVIST et al., 1994), as quais se mostraram capazes de aumentar *in vitro* a fagocitose de leveduras pelos hemócitos.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* é uma proteína monomérica, com PM próximo a 100 kDa, sendo capaz de induzir de maneira expressiva a ativação do sistema proPO após complexada com β -1,3-glicanas. Além disso, foi mostrado pela primeira vez que essa molécula é capaz de reconhecer células de fungos (leveduras), promovendo aglutinação celular. Sendo assim, esse trabalho contribui para uma maior compreensão do sistema imune das espécies nativas de camarões com

potencial para cultivo no sul do Brasil, através do estudo dessa importante proteína de reconhecimento-padrão, a β GBP, a qual poderá, mediante estudos futuros, ser utilizada como um imunomarcador para avaliar as condições de saúde desses animais.

5. CONCLUSÕES

- A β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*, foi purificada em duas etapas, através da técnica de precipitação por baixa força iônica seguida de cromatografia de troca aniônica, onde as frações purificadas foram eluídas com aproximadamente NaCl 0,22 M.
- O anticorpo policlonal dirigido contra a β GBP de *Litopenaeus vannamei* reconheceu de maneira inequívoca uma única banda protéica de 100 kDa, tanto no plasma quanto na fração purificada de *F. paulensis* e *L. schmitti*, confirmando tratar-se da β GBP desses peneídeos.
- O peso molecular encontrado para a β GBP das espécies nativas *F. paulensis* e *L. schmitti* (~100 kDa) apresentou-se semelhante ao descrito para outras espécies de camarões marinhos.
- A análise por espectrometria de massa dos produtos de digestão da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* mostrou que resíduos idênticos da β GBP de *F. paulensis* e *L. schmitti* cobriram 10% e 16%, respectivamente, da sequência da β GBP de *L. vannamei*, indicando uma homologia relativa entre a β GBP desses três peneídeos.
- O complexo β GBP-laminarina induziu um aumento de cerca de 3 vezes da atividade da PO quando comparado ao aumento parcial induzido pela β GBP ou laminarina não-complexadas, o que demonstra a participação desse complexo na ativação do sistema proPO dos camarões nativos.
- Apesar da participação no sistema de ativação da proPO, não foi encontrada uma atividade serino-proteásica da β GBP ou do complexo β GBP-laminarina em ambas as espécies estudadas.
- A β GBP demonstrou possuir capacidade aglutinante quando incubada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, o que sugere a presença em sua estrutura, de no mínimo dois sítios de ligação ao padrão molecular, β -1,3-glicanas.

6. PERSPECTIVAS

O presente trabalho é parte integrante de um projeto maior que detectou outras moléculas (PAM e PRPs) que participam do sistema de defesa de camarões peneídeos nativos. Esse projeto visa uma maior compreensão do sistema imune desses animais e de sua capacidade em responder a injúrias provocadas por patógenos. Para tal, estudos posteriores devem ser conduzidos visando:

1. Verificar a presença da sequência RVRR, possível sítio de clivagem envolvido no processamento da proteína madura, através do sequenciamento da região C-terminal da β GBP de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*.
2. Identificar a capacidade opsonizante da β GBP dos camarões nativos mediante ensaios de fagocitose de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Analisar a expressão gênica da β GBP em camarões injetados com fragmentos da parede celular de fungos (zimozana) ou com RNA dupla fita sintético (Poly C:G ou Poly I:C), mimetizando infecções fúngica e viral, respectivamente.

Além de contribuir para um maior conhecimento do sistema imune dos camarões nativos, esses resultados poderão, ainda, revelar o potencial dessa molécula como ferramenta biológica para avaliar a saúde dos camarões, contribuindo assim para o sucesso dos cultivos.

REFERÊNCIAS

- ASPÁN, A.; SÖDERHÄLL, K. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activating by an endogenous serine proteinase. **Insect Biochemistry**, v. 21, p. 363-373, 1991.
- BARRACCO, M.A.; DUVIC, B.; SÖDERHÄLL, K. The beta-1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a beta-1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. **Cell and tissue research**, v. 266, p. 491-497, 1991.
- BARRACCO, M.A.; PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.D. Inmunologia de crustaceos, con enfasis en camarones. In: VIELKA, M.Q.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Guía Práctica de Inmunología y Patología del Camarón**, Ed. CYTED, Panamá, p. 169-224, 2008.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 249-254, 1976.
- CERENIUS, L.; LIANG, Z.; DUVIC, B.; KEYSER, P.; HELLMANY, U.; TAPIO-PALVALL, E.; IWANAGA, S.; SÖDERHÄLL, K. Structure and biological activity of a beta-1,3-Dglucan-binding protein in crustacean blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 29462-29467, 1994.
- CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116-126, 2004.
- DECKER, H.; JAENICKE, E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 673-687, 2004.
- DUVIC, B.; SÖDERHÄLL, K. Purification and characterization of a beta-1,3-glucan binding-protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 9327-9332, 1990.
- DUVIC, B.; SÖDERHÄLL, K. Purification and partial characterization of a beta-1,3-glucan-binding-protein membrane-receptor from blood-cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 207, p. 223-228, 1992.
- DUVIC, B.; SÖDERHÄLL, K. Beta-1,3-glucan-binding proteins from plasma of the fresh-water crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 13, p. 403-408, 1993.
- ESCOBEDO-BONILLA, C.M.; ALDAY-SANZ, V.; WILLE, M.; SORGELOOS, P.; PENSART, M.B.; NAUWYNCK, H.J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1-18, 2008.

FAO – **Food and Agriculture Organization**. Fisheries and Aquaculture Department, Aquaculture Newsletter, 36 p., 2007.

FIGUEROA-SOTO, C.G.; CALDERÓN DE LA BARCA, A.M.; VAZQUEZ-MORENO, L.; HIGUERA-CIAPARA, I.; YÉPIZ-PLASCENCIA, G. Purification of hemocyanin from white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, by immobilized metal affinity chromatography. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. B117, p. 203-208, 1997.

GRANJA, C.B.; VIDAL, O.M.; PARRA, G.; SALAZAR, M. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, p. 175-180, 2006.

HARRIS, E.L.V. Concentration of the extract. In: HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. **Protein purification methods: a practical approach**, New York, p. 125-172, 1989.

HENNIG, O.L.; ANDREATTA, E.R. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* (Pérez and Farfante, 1967). **Aquaculture**, v. 164, p. 167-172, 1998.

HERSKOVITS, T.T. Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. B91, p. 597-611, 1988.

IWANAGA, S.; LEE, B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 128-150, 2005.

JAIME, B.; GALINDO, J. Dietas practicas para el cultivo de *Litopenaeus schmitti*: una revisión. **Revista Electrónica de Veterinária**, VII (12) Dezembro, 2006. Disponível em <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>>. Acesso em 28 de maio de 2008.

JIMENEZ-VEGA, F.; SOTELO-MUNDO, R.R.; ASCENCIO, F.; VARGAS-ALBORES, F. Beta-1,3-D glucan binding protein (BGBP) from the white shrimp, *Penaeus vannamei*, is also a heparin binding protein. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, p. 171-181, 2002.

JOHANSSON, M.W.; HOLMBLAD, T.; THÖRNQVIST, P.O.; CAMMARATA, M.; PARRINELLO, N.; SÖDERHÄLL, K. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 917-925, 1999.

KAUTSKY, N.; RONNBACK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives of management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, S.Y.; WANG, R; SÖDERHÄLL, K. A lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization and cDNA cloning. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 1337–43, 2000.

LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, p. 421-437, 2002.

MARQUES, M.R.F.; BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 23-44, 2000.

NAPPI, A.J.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. **Pigment Cell Research**, v. 6, p. 117-126, 1993.

NAPPI, A.J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioassays**, v. 22, p. 469-480, 2000.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C.C.; GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 14, p. 37-51, 2004.

PERAZZOLO, L.M.; BARRACCO, M.A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 21, p. 385-395, 1997.

PERAZZOLO, L.M.; LORENZINI, D.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M.A. Purification and partial characterization of the plasma clotting protein from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. B142, p. 302-307, 2005.

PÉREZ-FARFANTE, J.; KENSLE, B. **Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns oh the world**. In: Key of diagnoses for the families and genera. Éditions du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, p. 233, 1997.

RODRIGUEZ, N.A.; BOULO, V.; MIALHE, E.; BACHÈRE, E. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 1043-1050, 1995.

RODRIGUEZ, J.; BAYOT, B.; AMANO, Y.; PANCHANA, F.; DE BLAS, I.; ALDAY, V.; CALDERÓN, J. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 439-50, 2003.

ROMO-FIGUEROA, M.G.; VARGAS-REQUENA, C.; SOTELO-MUNDO, R.R.; VARGAS-ALBORES, F.; HIGUERA-CIAPARA, I.; SÖDERHÄLL, K.; YÉPIZ-PLASCENCIA, G. Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the

deduced amino acid sequence and the native protein structure. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 713-726, 2004.

RUIZ-VERDUGO, L.M.; GARCÍA-BAÑUELOS, M.; VARGAS-ALBORES, F.; HIGUERACIAPARA, I.; YÉPIZ-PLASCENCIA, G.M. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 91-96, 1997.

SEIFFERT, W.Q.; DERNER, R.B.; ANDREATTA, E.R. **Potencial e perspectivas do cultivo de camarões marinhos no estado de Santa Catarina, sul do Brasil**. I Congresso Sul-Americano de Aquicultura, Recife-PE, Brasil, resumo 103, 1998.

SELLOS, D.; LEMOINE, S.; VAN WORMHOUDT, A. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. **FEBS Lett**, v. 407, p. 153-158, 1997.

SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 797, p. 99-104, 1984.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 23-28, 1998.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 53-69, 2000.

THÖRNQVIST, P.O.; JOHANSSON, M.W.; SÖDERHÄLL, K. Opsonic activity of cell adhesion proteins and β -1,3-glucan-binding proteins from two crustaceans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 18, p. 3-12, 1994.

VARGAS-ALBORES, F.; JIMENEZ-VEGA, F.; SÖDERHÄLL, K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 20, p. 299-306, 1996.

VARGAS-ALBORES, F.; JIMENEZ-VEGA, F.; YÉPIZ-PLASCENCIA, G. Purification and comparison of beta-1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 116B, p. 453-458, 1997.

VARGAS-ALBORES, F.; YÉPIZ-PLASCENCIA, G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture**, v. 191, p. 13-21, 2000.

WANG, R.; LEE, S.Y.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 895-902, 2001.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Proteomics in practice. **A Laboratory Manual of Proteome Analysis**, Wiley-VCH, WEINHEIM, 2002.

WINCLER DA COSTA, S. **Vírus da Mancha Branca em Santa Catarina** (dados da EPAGRI). Palestra apresentada no Seminário “Ações para a defesa das enfermidades dos camarões”. Florianópolis, 11 de abril de 2006.

YÉPIZ-PLASCENCIA, G.; VARGAS-ALBORES, F.; JIMENEZ-VEGA, F. Shrimp plasma HDL and beta-glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 309-314, 1998.

YÉPIZ-PLASCENCIA, G.; GALVÁN, T.G.; VARGAS-ALBORES, F.; GARCÍA-BAÑUELOS, M. Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. **Marine Biotechnology**, v. 2, p. 485–492, 2000.